



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Camila Lisarb Velasquez Bastolla

Contaminantes persistentes e de preocupação emergente em áreas costeiras de Santa Catarina e avaliação dos efeitos nos sistemas de biotransformação e estresse oxidativo em ostras *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) e *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757)

Florianópolis

2023

Camila Lisarb Velasquez Bastolla

Contaminantes persistentes e de preocupação emergente em áreas costeiras de Santa Catarina e avaliação dos efeitos nos sistemas de biotransformação e estresse oxidativo em ostras *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) e *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757)

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Aquicultura

Orientador: Prof. Afonso Celso Dias Bainy, Dr.

Co-orientador: Prof. Camilo Dias Seabra Pereira, Dr.

Florianópolis

2023

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

Bastolla, Camila Lisarb Velasquez

Contaminantes persistentes e de preocupação emergente em áreas costeiras de Santa Catarina e avaliação dos efeitos nos sistemas de biotransformação e estresse oxidativo em ostras *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) e *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) / Camila Lisarb Velasquez Bastolla ; orientador, Afonso Celso Dias Bainy, coorientador, Camilo Dias Seabra Pereira , 2023.

161 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. poluição aquática. 3. biomarcadores. 4. biotransformação. 5. monitoramento ambiental. I. Bainy, Afonso Celso Dias . II. , Camilo Dias Seabra Pereira. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Camila Lisarb Velasquez Bastolla

Contaminantes persistentes e de preocupação emergente em áreas costeiras de Santa Catarina e avaliação dos efeitos nos sistemas de biotransformação e estresse oxidativo em ostras *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) e *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757)

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Afonso Celso Dias Bainy, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Profª. Gisela de Aragão Umbuzeiro, Dra.
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Prof. Juliano Zanette, Dr.
Universidade Federal de Rio Grande (FURG)

Profª. Flávia Lucena Zacchi, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Aquicultura

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Afonso Celso Dias Bainy, Dr.
Orientador

Dezembro, 2023.

Dedico esta tese
À minha amada família e amigos

AGRADECIMENTOS

Durante o doutorado, valiosos ensinamentos me foram repassados...e os mesmos superam os experimentos, atividades enzimáticas, extrações de RNA, reações de qPCR, discussões, análises estatísticas realizados ao longo deste processo. Como boa canceriana *coração-mole* que sou expresso aqui meus agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente nesta etapa:

Primeiramente, agradeço a minha família. À minha mamis, pela educação privilegiada, carinho, dedicação e incentivo. Ao mano, pelas conversas que tranquilizam e pelo cuidado. À minha cunhada Karen, pelo carinho, atenção e cafezinhos essenciais para a redação desse documento. Ao meu marido, Herculano Cella, por ser meu companheiro de todas as horas! Por todo o amor, companheirismo, ajuda, sonhos compartilhados, alegrias, paciência... Te amo, neguinho! Agradeço também aos meus sogros, Karim e Paulo, que sempre me acolheram de forma carinhosa.

Ao meu orientador, Prof. Afonso Bairy, agradeço os ensinamentos, confiança e apoio durante toda a minha formação profissional e acadêmica. Agradeço por abrir as portas do universo científico quando era apenas uma aluna deslumbrada com a bioquímica. Muito obrigada, Afonso!

Ao Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), pelo convívio e alegrias (dentro e fora do laboratório) nestes quase 9 anos. No LABCAI tive a oportunidade de compartilhar diversas experiências com pessoas incríveis, que são referências para mim tanto do ponto de vista científico, quanto pessoal. Ao Miguel Serrano e Daína Lima pela parceria forte nos trabalhos de monitoramento e coletas infinitas! À Bárbara Righetti, por toda ajuda na bancada, análises estatísticas e discussão de resultados. Ao Jacó, pelos conselhos e ajuda na resolução dos “BOs” científicos. À Mariana Pilotto e Vanessa Shadeck pela ajuda nas análises químicas, extrações de RNA e corridas de qPCR realizadas no experimento de exposição das ostras à cocaína. À Clarissa Ferreira, pelo suporte das análises estatísticas e discussão dos resultados. Ao Pedro A. Mattos e Júlia Martim, meus queridos ICs, pela oportunidade de orientação e apoio nos perrengues científicos. Ainda, agradeço aos queridos: Vera, Lígia, Luiza, Gui, Luiz, Isis, Diego e Clei, pelos momentos de descontração e

estímulo nas adversidades acadêmicas. Agradeço também a Riso, Flávia e Karim, pelos ensinamentos, conselhos e oportunidades de colaboração.

Ao Prof. Eduardo Alves de Almeida da Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB), pela confiança depositada em mim para o desenvolvimento do segundo trabalho dessa tese. Agradeço o auxílio e a disposição em esclarecer minhas dúvidas. Muito obrigada, Edu!

Ao Prof. Camilo Dias Pereira Seabra da Universidade Estadual Paulista (UNESP) por todo o auxílio e presteza quanto ao planejamento, organização, avaliação e interpretação dos resultados gerados no experimento de exposição das ostras à cocaína, descrito no quarto capítulo desta tese. Muito obrigada, Camilo!

Ao Dr. Carlos Henrique do Amaral Miranda Gomes (LMM-UFSC), querido Tatu, por toda ajuda nos delineamentos do segundo e quarto capítulo desta tese. Grata também por toda ajuda nas coletas do PRONEM, identificações e discussões sobre o mundo das ostras.

À Satie Taniguchi e à Prof. Márcia Bicego do Instituto Oceanográfico da USP pelos auxílios nas análises de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nos tecidos das ostras avaliadas no segundo capítulo desta tese.

Ao Dr. Thiago Caíque Alves (FURB), pelo auxílio nas análises químicas de contaminantes emergentes e persistentes realizadas nas amostras do monitoramento PRONEM. Gostaria de agradecer também à MsC Camila F. Rutkoski pelo processamento das amostras da coleta de verão para análises químicas.

À banca examinadora da tese de doutorado - membros titulares: Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro, Dr. Juliano Zanette, Dra. Flávia Lucena Zacchi; e membros suplentes: Dra. Maria Risoleta Freire Marques, Dr. Denis Moledo de Souza Abessa e Dra. Karim Hahn Lüchmann. Agradeço pela disponibilidade em participar desta etapa na minha formação, pelo tempo dedicado na leitura e revisão desse documento, assim como pelas valiosas contribuições.

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

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida durante o doutorado.

À PETROBRAS (processo nº 425840/2016-6) e ao CNPq (processo nº 311725/2021-0), pelo financiamento indireto desta tese.

Muito obrigada!

LISTA DE TRABALHOS GERADOS

Artigo gerado a partir desta tese

BASTOLLA, C. L.V. et al. 2022. Molecular changes in oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) from aquaculture areas of Santa Catarina Island bays (Florianópolis, Brazil) reveal anthropogenic effects. *Chemosphere*, v. 307, p. 135735.

Outros artigos publicados durante o período de doutorado

DIAS, V. H. V. et al. 2022. Characterisation of UDP-glucuronosyltransferase activity in sea turtle *Chelonia mydas*. *Xenobiotica*, v. 52, n. 12, p. 1011-1019.

SALDAÑA-SERRANO, M. et al. 2022. Microplastics and linear alkylbenzene levels in oysters *Crassostrea gigas* driven by sewage contamination at an important aquaculture area of Brazil. *Chemosphere*, v. 307, p. 136039.

BASTOLLA, C. L.V. et al. 2023. Comparative biochemical and molecular responses of biotransformation and antioxidant systems in three species of *Crassostrea* (Sacco, 1897) oysters exposed to chrysene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 270, p. 109642.

GROTT, S. C. et al. 2023. Effects of the herbicide ametryn on development and thyroidogenesis of bullfrog tadpoles (*Aquarana catesbeiana*) under different temperatures. *Environmental Pollution*, v. 322, p. 121159.

VILKE, J. M. et al. 2023. Field study of metal concentrations and biomarker responses in resident oysters of an estuarine system in southern Brazil. *Chemosphere*, v. 337, p. 139288.

CRUZ, G. S. et al. 2023. Biochemical responses of the mussel *Perna perna* after exposure to environmental concentrations of the UV filter Benzophenone-3. *Xenobiotica*, v. 53, n. 4, p. 309-319.

FERREIRA, C.P. et al. 2023. Effects of cadmium and zinc on gene expression of novel molecular biomarkers in the mangrove oyster *Crassostrea gasar*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 270, p. 109641.

CELLA, H. et al. 2023. PAR regulation of photoprotection in *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae): roles of doses and irradiances. *Journal Of Applied Phycology*.

BUCHELI, J. et al. 2023. Bacterial assemblages structure in intensive cultivations of the microalga *Tetradismus obliquus*. *Journal Of Basic Microbiology*.

REIS, I. M. M. et al. 2023. Gender influences molecular and histological biomarkers in mature oysters *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) after pyrene exposure. *Chemosphere*, v. 311, p. 136985.

CARDOSO, L. et al. 2023. Dietary supplementation with *Lippia sidoides* essential oil improves organ integrity but the specific activity of antioxidant enzymes is dose-dependent in *Danio rerio*. *Journal Of Animal Physiology and Animal Nutrition*.

RESUMO

A poluição da água é um dos principais desafios para o desenvolvimento sustentável no antropoceno. Neste contexto, os ambientes marinhos e costeiros são os principais receptores de diversos contaminantes antropogênicos, incluindo contaminantes emergentes (CEs) e poluentes orgânico persistentes (POPs). Em nível nacional, Santa Catarina destaca-se como o principal produtor de moluscos bivalves, como as ostras do Pacífico *Crassostrea gigas* e as ostras nativas *Crassostrea gasar*. Além disso, ambas espécies são empregadas como organismos bioindicadores de qualidade ambiental em diversos estudos realizados em todo o mundo. Neste contexto, o primeiro trabalho desta tese avaliou as respostas moleculares de genes envolvidos na biotransformação e defesa antioxidante em brânquias de ostras do Pacífico cultivadas nas Baías Norte (Sambaqui, Santo Antônio e Serraria) e Sul (Caieira, Tapera e Imaruí) de Florianópolis. Neste trabalho observamos uma maior ocorrência de HPAs nos animais provenientes de SER e IMA. Similarmente, houve uma indução de genes envolvidos na fase I (*CYP1A-like*, *CYP356A1-like*, *CYP2AU2-like* e *CYP2-like*) e II (*SULT-like*, *GSTO.4A-like*) de biotransformação, e de defesa antioxidante (*SOD-like*, *CAT-like*) nas ostras destes locais. No segundo trabalho desta tese monitoramos a ocorrência de contaminantes persistentes e emergentes em ostras nativas *C. gasar* em diferentes regiões da costa de SC (São Francisco do Sul, Itajaí, Grande Florianópolis e Laguna). Além disso, investigamos as respostas de biomarcadores de biotransformação, estresse oxidativo, neurotransmissão e proteção térmica nas ostras. Foram detectados os níveis de 75 compostos, incluindo antibióticos, desreguladores endócrinos, anti-inflamatórios não-esteroidais, HPAs, PCBs e pesticidas. Os contaminantes emergentes foram quantificados em todas as áreas. Ostras *C. gasar* coletadas na região centro-norte apresentaram uma indução nos sistemas de biotransformação (*CYP450s*, *SULT* e *GST*) e defesa antioxidante (*SOD*, *CAT*, *GPx*). Os animais coletados em Florianópolis apresentaram maiores níveis de MDA em comparação às demais regiões. Análises de correlação indicaram possíveis associações entre os contaminantes e as variáveis ambientais na resposta dos biomarcadores avaliados. O último estudo realizado nesta tese investigou as respostas de biomarcadores de biotransformação (fase I e II), neurotransmissão e estresse oxidativo em ostras *C. gigas* expostas a duas concentrações ambientalmente relevantes de cocaína ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$) durante 24h e 96h. Os animais expostos à menor dose de cocaína apresentaram uma redução nos níveis de transcritos de *5HT-like*, *CYP1A-like1*, *CYP356A1*, *CAT-like* em relação ao controle. Em contrapartida, houve um aumento nos transcritos do gene *CbE5A-like* em ostras expostas a ambas concentrações avaliadas. Além disso, observamos uma redução na atividade *SOD* em animais expostos à $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de COC, e das atividades *CAT* e *GPx* nos animais expostos à $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de COC. Não foram observadas alterações significativas nas atividades *EROD* e *GST*. Em resumo, os resultados observados nesta tese indicam efeitos biológicos decorrentes da contaminação de origem antrópica nos ambientes marinhos e costeiros de Santa Catarina, evidenciando a necessidade de melhorias do saneamento básico na região. Além disso, contribui na busca por novos biomarcadores de contaminação aquática por CEs em ostras *C. gigas*.

Palavras-chave: Aquicultura, poluição aquática, biomarcadores, biotransformação, monitoramento ambiental.

ABSTRACT

Water pollution is one of the main challenges for sustainable development in the Anthropocene. In this context, marine and coastal environments are the primary receptors of various anthropogenic contaminants, including emerging compounds (ECs) and persistent organic pollutants (POPs). At a national level, Santa Catarina stands out as the main producer of bivalve mollusks, such as the Pacific oysters *Crassostrea gigas* and the native oyster *Crassostrea gasar*. Furthermore, both species are used as bioindicator organisms of environmental quality in several studies worldwide. In this context, the first work of this thesis evaluated the molecular responses of genes involved in biotransformation and antioxidant defense in gills of Pacific oysters cultivated in the North (Sambaqui, Santo Antônio, and Serraria) and South (Caieira, Tapera, and Imaruí) Bays of Florianópolis. In this work, we observed an occurrence of PAHs in animals from SER and IMA. Similarly, there was an induction of genes involved in phases I (*CYP1A-like*, *CYP356A1-like*, *CYP2AU2-like*, and *CYP2-like*) and II (*SULT-like*, *GSTO.4A-like*) of biotransformation, and antioxidant defense (*SOD-like*, *CAT-like*) in oysters from these locations. In this thesis's third chapter, we monitored the occurrence of persistent and emerging contaminants in native oysters *C. gasar* in different regions of the coast of SC (São Francisco do Sul, Itajaí, Grande Florianópolis and Laguna). Furthermore, we investigated biomarker responses of biotransformation, oxidative stress, neurotransmission and thermal protection in oysters. The bioaccumulation levels of 75 compounds were detected, including antibiotics, endocrine disruptors, non-steroidal anti-inflammatory drugs, PAHs, PCBs and pesticides. Emerging contaminants were quantified in all areas. Oysters *C. gasar* oysters from the central-north region showed an induction in biotransformation systems (CYP450s, SULT and GST) and antioxidant defense (SOD, CAT, GPx). Animals collected in Florianópolis showed higher levels of MDA compared to other regions. Correlation analyses indicated possible associations between contaminants and environmental variables in the response of the evaluated biomarkers. The last study carried out in this thesis investigated the responses of biomarkers of biotransformation (phase I and II), neurotransmission and oxidative stress in *C. gigas* oysters exposed to two environmentally relevant concentrations of cocaine ($0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ and $5.0 \mu\text{g L}^{-1}$) for 24h and 96h. Animals exposed to the lowest dose of cocaine showed a reduction in the levels of *5HT-like*, *CYP1A-like1*, *CYP356A1*, and *CAT-like* transcripts compared to the control. In contrast, there was an increase in *CbE5A-like* gene transcripts in oysters exposed to both concentrations evaluated. Furthermore, we observed a reduction in SOD activity in animals exposed to $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ of COC and in CAT and GPx activities in animals exposed to $5.0 \mu\text{g L}^{-1}$ of COC. No significant changes were observed in EROD and GST activities. In summary, the results observed in this thesis indicate the biological effects resulting from contamination of anthropogenic origin in the marine and coastal environments of Santa Catarina, highlighting the need for improvements in basic sanitation in the region. Furthermore, it contributes to the search for new biomarkers of aquatic contamination by ECs in *C. gigas* oysters.

Keywords: Aquaculture, aquatic pollution, biomarkers, biotransformation, environmental monitoring.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Visão geral simplificada das principais contribuições da aquicultura para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. 25
- Figura 2.** Distribuição dos principais grupos de espécies cultivadas em cada estado brasileiro. 27
- Figura 3.** Principais vias de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e as enzimas dos sistemas de defesa antioxidante e de biotransformação. 33
- Figura 4.** Espécies de ostras avaliadas no presente estudo. (A) Ostras do Pacífico *C. gigas* (B) Ostras nativas *C. gasar*. (C) Classificação taxônomica das ostras. 36

CAPÍTULO II

- Figure 1.** Map of study sites (A) Brazil map and detailed location of Santa Catarina (Southern Brazil), (B) Map of Santa Catarina state with detailed location of 40 cities that compose Florianópolis metropolitan area, (C) Studies sites of the Bays of Santa Catarina Island (BSCI) and detailed location of sites in North Bay (SAM: Sambaqui, SAL: Santo Antônio de Lisboa, SER: Serraria) and South Bay (CAI: Caieira, TAP: Tapera, IMA: Imaruí). 44
- Figure 2.** Polycyclic aromatic hydrocarbon (A: Pyrene, B: C1-Pyrene, C: Fluoranthene, D: Perylene) concentrations (mean \pm standard deviation) in soft tissues of *C. gigas* oysters from six farming areas in North and South Bays of Santa Catarina Island (BSCI). The results are expressed in ng g⁻¹ dry weight. Differences were considered significant when $p < 0.05$ 50
- Figure 3.** Transcript levels of biotransformation (*CYP1A-like1*, *CYP356A1-like*, *CYP2AU2-like*, *CYP2-like*, *SULT-like* *GSTA1A-like*, *GSTO.4A-like*) and antioxidant defense (*SOD-like*, *CAT-like*) genes in gills of oysters *C. gigas* from six farming areas in Bays of Santa Catarina Island (BSCI). Statistical differences between each farming area are indicated by lowercase letters ($p < 0.05$). 52
- Figure 4.** (A) Principal component analysis (PCA) for the molecular biomarkers (*CYP1A1-like*, *CYP2-like*, *CYP2AU2-like*, *CYP256A1*, *GSTA1A-like*, *GSTO.4A-like*, *SULT-like*, *SOD-like*, *CAT-like*), PAH concentrations (total, fluoranthene and pyrene) and thermotolerant coliforms (TC) in the gills of *C. gigas* oysters collected from six

aquaculture areas from north and south bays of Santa Catarina Island (Florianópolis, SC – Brazil). The observations are represented by colored symbols described in legend, whereas the variables are represented by their correlations. (B) Scree plot with extracted eigenvalues per dimension. (C) Scree plot percentage of explained variances per dimension. (D) and (E) Contributions proportional to variables in dimension 1 and 2, respectively..... 57

Figure 5. Default radar plot containing the selected biomarkers in gills of *C. gigas* for each monitoring sites in North Bay (SAM: Sambaqui, SAL: Santo Antônio de Lisboa, SER: Serraria) and South Bay (TAP: Tapera, IMA: Imaruí). Caieira (CAI), highlighted in the center by blue line, selected as a reference group. 59

CAPÍTULO III

Figura 1. Mapa das áreas selecionadas para o monitoramento de contaminantes persistentes e emergentes em Santa Catarina (Sul, Brasil). 79

Figura 2. Gráfico de radar das concentrações totais de contaminantes emergentes (Σ EC: antibióticos, compostos desreguladores endócrinos e anti-inflamatórios não esteróides) e persistentes (Σ POPs: PAHs, PCBs e pesticidas) (ng g^{-1} peso úmido) avaliados em ostras *C. gasar* coletadas em diferentes regiões de Santa Catarina: São Francisco do Sul (SF-A e SF-B), Itajaí (IT-A), Baías Norte (BN-A e BN-B) e Sul (BS-A e BS-B) de Florianópolis e Laguna (LG-A). 84

Figura 3. Níveis de transcritos dos genes envolvidos nas fases I (*CYP1-like*, *CYP2AUI-like* e *CYP356A1*) e II (*GSTO-like* e *SULT-like*) de biotransformação de xenobióticos em brânquias de ostras *Crassostrea gasar* coletadas em diferentes regiões de Santa Catarina: São Francisco do Sul (SF-A e SF-B), Itajaí (IT-A), Baías Norte (BN-A e BN-B) e Sul (BS-A e BS-B) de Florianópolis e Laguna (LG-A). Os valores estão apresentados na forma de média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre locais estão indicados por asterisco (*) 94

Figura 4. Atividade das enzimas envolvidas na defesa antioxidante (SOD, CAT, GPx), biotransformação de xenobióticos (GST), transmissão de impulso nervoso (AChE) e de dano oxidativo (MDA) em ostras *C. gasar* coletadas em diferentes regiões de Santa Catarina: São Francisco do Sul (SF-A e SF-B), Itajaí (IT-A), Baías Norte (BN-A e BN-B) e Sul (BS-A e BS-B) de Florianópolis e Laguna (LG-A). Os dados

estão apresentados na forma de média \pm desvio-padrão. Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre locais estão indicados por asteriscos (*) 99

- Figura 5.** (A) Matriz de correlação de Spearman entre os biomarcadores, variáveis ambientais (salinidade, pH e temperatura) e dados biométricos das ostras *C. gasar* coletadas nos diferentes locais da região costeira de Santa Catarina monitorados. (B) Matriz de correlação de Spearman entre os contaminantes e os biomarcadores avaliados em brânquias de ostras *C. gasar* coletadas nos diferentes locais da região costeira de Santa Catarina monitorados. Correlações positivas são exibidas em verde e correlações negativas em vermelho. A intensidade da cor e o tamanho do círculo são proporcionais aos coeficientes de correlação. Significância indicada por $*=p < 0,05$, $**=p < 0,01$ e $***=p < 0,001$ 102

CAPÍTULO IV

- Figura 1.** Esquema de exposição das ostras *Crassostrea gigas* à duas concentrações ambientalmente relevantes de cocaína. As ostras foram expostas durante 24h e 96h às concentrações de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 1$ ostra/béquer, totalizando 12 ostras por tratamento). O controle foi composto por água do mar e acetonitrila 0,05% 135
- Figura 2.** Níveis de transcritos dos genes (A) *CYP1A-like*; (B) *CYP356A1-like*; (C) *CbE4A-like*; (D) *CbE5A-like* e atividade das enzimas Glutathione S-Transferase (GST) (E) e 7-etoxiresorufina O-deetilase (EROD) (F) em brânquias de ostras *Crassostrea gigas* expostas à duas concentrações de cocaína em 24h de exposição. A sigla CT representa o grupo controle (água do mar + acetonitrila 0,05%). As siglas E1 e E2 representam os grupos expostos à cocaína nas concentrações $0,5$ e $5 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os dados estão apresentados na forma de média \pm desvio-padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) nos tratamentos em relação ao grupo controle. 140
- Figura 3.** Níveis de transcritos dos genes (A) *5HRT-like* e (B) *DOP2R-like* em brânquias de ostras *Crassostrea gigas* expostas à duas concentrações de cocaína em 24h de exposição. A sigla CT representa o grupo controle (água do mar + acetonitrila 0,05%). As siglas E1 e E2 representam os grupos expostos à cocaína nas concentrações $0,5$ e $5 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os dados estão apresentados na forma de média \pm desvio-padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) nos tratamentos em relação ao grupo controle. 141

Figura 4. Atividade das enzimas envolvidas na defesa antioxidante (SOD, CAT, GPx, GR, GPPDH) e marcadores de dano oxidativo (MDA) em brânquias de ostras *C. gigas* expostas à duas concentrações de cocaína durante 96 h. A sigla CT representa o grupo controle (água do mar + acetonitrila 0,05%). As siglas E1 e E2 representam os grupos expostos à cocaína nas concentrações 0,5 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os dados estão apresentados na forma de média \pm desvio-padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) nos tratamentos em relação ao grupo controle..... 144

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Levantamento bibliográfico dos principais efeitos biológicos em moluscos bivalves relacionados à diferentes classes de contaminantes persistentes e emergentes descritos na literatura. 31
- Tabela 2.** Principais biomarcadores de contaminação aquática empregados em estudos ecotoxicológicos com moluscos bivalves. 35

CAPÍTULO II

- Table 1.** Water quality parameters in aquaculture areas of monitoring 61
- Table S- 1.** Selected genes, primer sequences and GenBank access 61
- Table S- 2.** Polycyclic aromatic hydrocarbon concentration in whole soft tissues of *Crassostrea gigas* oysters collected at six sites at north and south Bays of Santa Catarina Island (BSCI). The results are expressed in ng g^{-1} dry weight. < BDL = Below detection limit (2.5 ng g^{-1}). Bold represent sites and PAHs were observed with statistical difference ($p < 0.05$) ($n=3$ pools of 4 oysters from each site). 62

CAPÍTULO III

- Tabela 1.** Parâmetros de qualidade de água coletados nos locais de monitoramento na região costeira de Santa Catarina: São Francisco do Sul (SF-A e SF-B), Itajaí (IT-A), Florianópolis: Baía Norte (BN-A e BN-B), Baía Sul (BS-A e BS-B) e Laguna (LG-A). A sigla *nd* representa *não determinado* 122
- Tabela S-1.** Genes selecionados e as suas funções previstas, sequências de primers e tamanhos de amplicon em pares de base (pb). 122
- Tabela S-2.** Informações sobre os locais de amostragem para as ostras *Crassostrea gasar* nas regiões costeiras de Santa Catarina (Brasil) (consulte as localizações no mapa). 123
- Tabela S-3.** Dados de biometria das ostras *C. gasar* coletadas em diferentes locais da região costeira de Santa Catarina (Brasil): Região Norte - São Francisco do Sul (SF-A e SF-B); Alto Vale do Itajaí - Itajaí (IT-A); Região Central - Florianópolis: Baía Norte (BN-A e BN-B) e Baía Sul (BS-A e BS-B), Região Sul - Laguna (LG-A). 124

Tabela S-4. Concentrações ambientais de contaminantes de preocupação emergente (AB: antibióticos, DE: desreguladores endócrinos, AINEs: anti-inflamatórios não-esteroidais, PES: pesticidas) detectados em amostras de ostras <i>Crassostrea gasar</i> coletadas em diferentes regiões costeiras de Santa Catarina (Brasil). Os resultados estão expressos em ng g ⁻¹ . Em negrito: valores de contaminantes quantificados em amostras de ostras.	125
Tabela S-5. Concentrações ambientais de pesticidas (PEST) detectados em ostras <i>C. gasar</i> coletadas em diferentes regiões costeiras de Santa Catarina (Brasil). Os resultados estão expressos em ng g ⁻¹ . Em negrito: valores de contaminantes quantificados em amostras de ostras.	126
Tabela S-6. Concentrações de HPAs (ng g ⁻¹ , peso úmido) detectadas em ostras <i>C. gasar</i> coletadas em áreas costeiras de Santa Catarina (Brasil).	128
Tabela S-7. Concentrações de PCBs (ng g ⁻¹ , peso úmido) detectadas em ostras <i>C. gasar</i> coletadas em áreas costeiras de Santa Catarina (Brasil).	129

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

® Marca comercial registrada, do inglês "Registered Trademark"

µg: micrograma

µL: microlitro

AB: Antibiótico

AINEs: Anti-inflamatórios não-esteroidais

ATSDR — *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*

BS: Baía Sul de Florianópolis (Santa Catarina, Brasil)

BN: Baía Norte de Florianópolis (Santa Catarina, Brasil)

CAT: enzima Catalase

CAT: gene Catalase

cDNA: DNA complementar

CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

cm: centímetro

EROs (ROS): Espécies Reativas de Oxigênio; do inglês *Reactive Oxygen Species*

g: grama

FURB: Fundação Universidade Regional de Blumenau

GPx: enzima Glutathione Peroxidase

GR: Glutathione Redutase

GSH: Glutathione reduzida

GSSG: Glutathione oxidada

GST: enzima Glutathione S-transferase

GST: gene Glutathione S-transferase – letra após a sigla representa isoforma

h: horas

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HSP70: Proteína de choque térmico 70

HPA: Hidrocarboneto policíclico aromático

IO-USP: Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

ITA: Itajaí

Kg: quilograma

L: litro

LABCAI: Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica

LABQOM: Laboratório de Química Orgânica Marinha LMM: Laboratório de Moluscos Marinhos

LG-A: Laguna (Santa Catarina, Brasil)

m: metros

M: molar

máx: máximo

MDA: malondialdeído

mg: miligrama

min: minutos

mín: mínimo

mL: mililitro

mM: milimolar

mRNA: RNA mensageiro

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida

NEPAq: Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola

ng: nanograma

nm: nanômetro
nM: nanomolar
n^o: número
O₂⁻: ânion superóxido
°C: graus Celsius
%: porcentagem
‰: partes por mil ou g. Kg⁻¹ (g de sal por Kg de água)
p: peso
p: significância estatística
POPs: poluentes orgânicos persistentes
PCB: do inglês, bifenila policlorada
PCR: reação em cadeia da polimerase; do inglês *polymerase chain reaction*
pH: potencial hidrogeniônico
PMSF: fenil-metil-sulfonil-fluoreto
qPCR: PCR quantitativo em tempo real
R²: parâmetro de avaliação de eficiência de qPCR em tempo real
RNA: ácido ribonucléico
s: segundos
SC: Santa Catarina
SF: São Francisco (Santa Catarina, Brasil)
SOD: enzima Superóxido Dismutase
SOD: gene Superóxido Dismutase
SULT: gene Sulfotransferase - letra após a sigla representa isoforma
UDESC: Universidade do Estado de Santa Catarina
UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina
USP: Universidade de São Paulo
v: volume
xg: força centrífuga aplicada

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	23
1.Introdução Geral e Motivação.....	23
1.1. Estrutura da tese.....	23
1.2 Revisão bibliográfica.....	25
1.2.1. Segurança alimentar global, desenvolvimento sustentável e aquicultura.....	25
1.2.2. A Maricultura em Santa Catarina: Um mar de oportunidades.....	27
1.2.3. Crescimento populacional urbano, saneamento básico e a poluição aquática em Santa Catarina.....	28
1.2.4. Efeitos dos contaminantes antropogênicos em moluscos bivalves.....	30
1.2.5. Sistemas de biotransformação de xenobióticos e defesa antioxidante.....	31
1.2.6. Monitoramento da poluição aquática: biomarcadores e moluscos bivalves como organismos bioindicadores.....	33
1.3 Objetivos.....	36
1.3.1 Objetivo geral.....	36
1.3.2 Objetivos específicos.....	36
CAPÍTULO II.....	39
2. Molecular responses in oysters <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1793) from aquaculture areas of Santa Catarina Island bays (Florianópolis, Brazil) reveal anthropogenic effects.....	39
2.1 Abstract.....	40
2.2 Introduction.....	41
2.3 Material and methods.....	43
2.3.1 Study area and animals collect.....	43
2.3.2 Water quality parameter and physicochemical analysis.....	44
2.3.3 Bioaccumulation of PAH in soft tissues of <i>C. gigas</i> oysters.....	44
2.3.4 Primer design.....	45
2.3.5 Total RNA isolation and cDNA synthesis by reverse transcription.....	45
2.3.6 Quantitative PCR analysis.....	46
2.3.7 Integrated Biomarker Response (IBR).....	46
2.3.8 Statistical analysis.....	46
2.4 Results and discussion.....	47
2.4.1 Water quality parameters.....	47

2.4.2 Levels of PAH in soft tissues of <i>C. gigas</i> oysters.....	48
2.4.3 Transcription levels of genes involved in biotransformation and antioxidant systems ..	51
2.4.4 Relationship between PAH levels and molecular responses observed in <i>C. gigas</i>	56
2.5 Conclusion	59
2.6 Supplementary material	60
2.7 References	63
CAPÍTULO III	74
Resumo	75
3.1 Introdução	76
3.2 Material e métodos	77
3.2.1. Áreas de estudo	77
3.2.2. Coleta do material biológico.....	79
3.2.3. Análises dos contaminantes	80
3.2.4. Extração de RNA total, transcrição reversa e avaliação dos níveis de transcritos via RT-qPCR.....	80
3.2.5. Processamento das amostras e ensaios dos biomarcadores bioquímicos	81
3.2.6. Imunodeteção da Proteína de Choque Térmico (HSP70).....	81
3.2.7. Análises estatísticas.....	82
3.3 Resultados e discussão	82
3.3.2. Níveis de contaminação e distribuição geográfica de CEs em ostras <i>C. gasar</i>	82
3.3.2.2. Antibióticos.....	85
3.3.2.3. Anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs).....	86
3.3.2. Níveis de contaminação, composição e distribuição geográfica dos POPs em ostras <i>C. gasar</i>	88
3.4.3. Respostas dos biomarcadores em ostras <i>C. gasar</i> e possíveis correlações entre os níveis de contaminantes.....	92
3.4.6. Influência dos fatores ambientais na resposta dos biomarcadores.....	99
3.4 Conclusão	104
3.5 Agradecimentos	104
3.6 Referências bibliográficas	104
3.7 Materiais e Informações Suplementares	118
CAPÍTULO iV	130
4. Respostas bioquímicas e moleculares em ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas à duas concentrações ambientalmente relevantes de cocaína	130

4.1 Resumo	131
4.2 Abstract	131
4.3 Introdução	132
4.4 Material e Métodos	134
4.4.1 Delineamento experimental e exposição das ostras à cocaína.....	134
4.4.2 Extração de RNA total, transcrição reversa e análises de RT-qPCR.....	135
4.4.3 Avaliação das enzimas envolvidas na biotransformação e defesa antioxidante	136
4.4.4 Análises estatísticas.....	137
4.5 Resultados e discussão	137
4.5.1 Respostas moleculares e bioquímicas envolvidas na biotransformação (fase I e II) em brânquias de <i>C. gigas</i>	137
4.5.2 Respostas transcricionais de genes de neurotransmissão em brânquias de <i>C. gigas</i>	140
4.5.3 Respostas transcricionais e enzimáticas envolvidas no estresse oxidativo em brânquias de <i>C. gigas</i>	143
4.6 Conclusão	146
4.7 Referências	146
CAPÍTULO V	152
5.1. Considerações finais.....	152
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL	154

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL E MOTIVAÇÃO

1.1. Estrutura da tese

Em concordância com o regulamento vigente do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina (PPGAQI/UFSC), os capítulos que compreendem os resultados gerados a partir da tese estão escritos sob a forma de artigo científico e formatados de acordo com a revista escolhida para publicação. As referências bibliográficas da introdução geral estão dispostas no final da tese, enquanto que as referências bibliográficas dos capítulos 2, 3 e 4 estão ao final de cada respectivo capítulo.

Esta tese está dividida em cinco capítulos. **O primeiro capítulo** apresenta uma breve contextualização acerca dos temas abordados na tese, objetivos gerais e específicos.

No segundo capítulo deste documento, apresentamos os resultados da avaliação dos níveis de transcritos envolvidos na biotransformação e estresse oxidativo em ostras *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) coletadas em áreas de cultivos impactadas na região metropolitana da Grande Florianópolis. Estes resultados foram apresentados no 9th *Ibero-American Congress on Contamination and Environmental Toxicology* (CICTA) no ano de 2021 e, posteriormente publicados na edição especial do evento na revista *Chemosphere* (QUALIS-1; IF: 8.943) (Bastolla et al., 2022).

O terceiro capítulo da tese apresenta os resultados do monitoramento de contaminantes emergentes e poluentes orgânicos persistentes realizado em 8 áreas costeiras de Santa Catarina (Brasil), localizadas nas regiões metropolitanas de São Francisco do Sul, Itajaí, Grande Florianópolis e Laguna. Neste trabalho foi realizado um diagnóstico (qualitativo e quantitativo), acerca da ocorrência de antibióticos, desreguladores endócrinos, anti-inflamatórios não-esteroidais, HPAs, pesticidas e PCBs. Neste trabalho também investigamos as respostas de biomarcadores envolvidos na biotransformação, estresse oxidativo, proteção de choque térmico e neurotransmissão em brânquias de *Crassostrea gasar*. Além disso, discutimos sobre as possíveis relações entre a ocorrência de contaminantes e a influência dos parâmetros ambientais na resposta dos biomarcadores. O artigo foi submetido à revista *Science of the Total Environment* (QUALIS-1; IF: 10.753).

Considerando a variedade de contaminantes emergentes presentes nos corpos d'água próximos a regiões urbanizadas, tais como as drogas ilícitas, o **quarto capítulo da tese** apresenta os **resultados preliminares** obtidos a partir da exposição de ostras *C. gigas* à cocaína à duas concentrações ambientalmente relevantes durante 24h e 96h. O objetivo deste trabalho foi avaliar alterações em nível transcricional e enzimático, biomarcadores envolvidos na

biotransformação, neurotransmissão e estresse oxidativo. O artigo foi redigido de acordo com as normas da revista *Aquatic Toxicology* (QUALIS-1; IF: 5.202). **O quinto capítulo** apresenta as conclusões e perspectivas gerais desta tese, como um todo, para futuros estudos ecotoxicológicos. Boa leitura!

Tabela 1. Resumo dos principais biomarcadores e ou/técnicas e contaminantes avaliados em cada estudo desta tese.

<i>Níveis de contaminantes nos tecidos moles das ostras</i>	2	3	4
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)		X	
Antibióticos (AB), compostos desreguladores endócrinos (EDCs), anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs)	X	X	
Pesticidas e bifenilas policloradas (PCBs)		X	
<i>Biomarcadores e/ou técnicas</i>	2	3	4
Atividade da enzima 7 etoxiresorufina O-deetilase (EROD)			X
Atividade da enzima Acetilcolinesterase (AChE)		X	
Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)		X	X
Atividade da enzima Catalase (CAT)		X	X
Atividade da enzima Glutaciona Peroxidase (GPx)		X	X
Atividade da enzima Glutaciona Redutase (GR)			X
Atividade da enzima Glutaciona S-Transferase (GST)		X	X
Atividade da enzima Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH)			X
Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica (MDA)		X	X
Imunodeteção da proteína de choque térmico subunidade 70 (HSP70)		X	
Níveis de transcrição de genes por PCR quantitativo em tempo real	X	X	X

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1. Segurança alimentar global, desenvolvimento sustentável e aquicultura

Antropoceno, a era geológica dos humanos, é descrito como a mais recente na escala de tempo geológico da terra, sendo marcada pelos efeitos da atividade humana na biodiversidade, mudanças climáticas, poluição atmosférica e aquática (LEWIS; MASLIN, 2015). Atualmente, a população global é de 8,1 bilhões de pessoas e estima-se que alcance 9,7 bilhões até 2050 (World Population Prospects, 2022) (ONU, 2022). Esse aumento representa diversos desafios em todos os setores, em especial à demanda por alimentos.

A erradicação da fome e da desnutrição são metas-chave da Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU), que visa ao Desenvolvimento Sustentável (ODS) globalmente. Atualmente, a aquicultura desempenha um papel fundamental no atendimento à crescente demanda global por alimentos, ao mesmo tempo em que busca preservar os recursos naturais e promover crescimento econômico, gerando emprego e renda (COSTELLO *et al.*, 2020). A atividade contribui para a maioria dos ODS (Fig. 1), com destaque para o ODS 14 (Vida abaixo da água) (FAO, 2022).

Figura 1. Visão geral simplificada das principais contribuições da aquicultura para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável.



Fonte: Adaptado de Troell et al (2023)

De acordo com dados recentes da FAO/ONU, a produção global aquícola em 2020 totalizou 87,5 milhões de toneladas (ton), com um valor correspondente a US\$ 281,5 bilhões (FAO, 2022). Essa produção apresentou significativa variação entre continentes, regiões e países, sendo liderada pelos países asiáticos, responsáveis por 70% da produção de organismos aquáticos, seguidos pelas Américas (12%), Europa (10%), África (7%) e Oceania (1%) (FAO, 2022).

Dentro desse panorama, 57,5 milhões de ton se referem à produção de peixes ósseos, sendo 49,1 milhões de ton provenientes da aquicultura em águas continentais, enquanto 8,3 milhões de ton são resultado da maricultura e aquicultura costeira. Além disso, outros organismos aquáticos, como moluscos (17,7 milhões de ton - US\$29,8 bilhões), crustáceos (11,2 milhões de ton - US\$81,5 bilhões), invertebrados aquáticos (525.000 ton - US\$ 2,5 bilhões) e espécies semi-aquáticas (537.000 ton - US\$ 5 bilhões) contribuíram para essa produção, destacando a importância da aquicultura para a segurança alimentar. Entre as espécies mais cultivadas, destacam-se os peixes ciprinídeos (carpas, tilápias), bagres, o salmão do Atlântico (*Salmo salar*), o peixe-leite (*Chanos chanos*), os crustáceos *Penaeus vannamei* e *Procambarus clarkii* e os moluscos bivalves, como *Crassostrea spp.*, *Ruditapes philippinarum* e pectinídeos (FAO, 2022).

Neste contexto, o Brasil se destaca como o segundo maior produtor de organismos aquáticos na região da América Latina e Caribe, e está classificado em 13º no ranking global, com uma produção total de 630.000 toneladas em 2020 (FAO, 2022). Valenti *et al* (2021) relatam que esses dados são considerados meras estimativas estatísticas, visto que o Brasil não reporta dados oficiais de aquicultura à FAO desde 2014. Com base nas informações obtidas junto às associações de produtores e em entrevistas com diversos *stakeholders*, estima-se que a produção aquícola no Brasil em 2019 ultrapassou 800 mil toneladas (VALENTI *et al.*, 2021; PeixeBR, 2022). A aquicultura brasileira se destaca pela diversidade, abrangendo mais de 60 espécies de organismos aquáticos comestíveis e cerca de 250 espécies de peixes ornamentais, invertebrados e plantas aquáticas (VALENTI *et al.*, 2021).

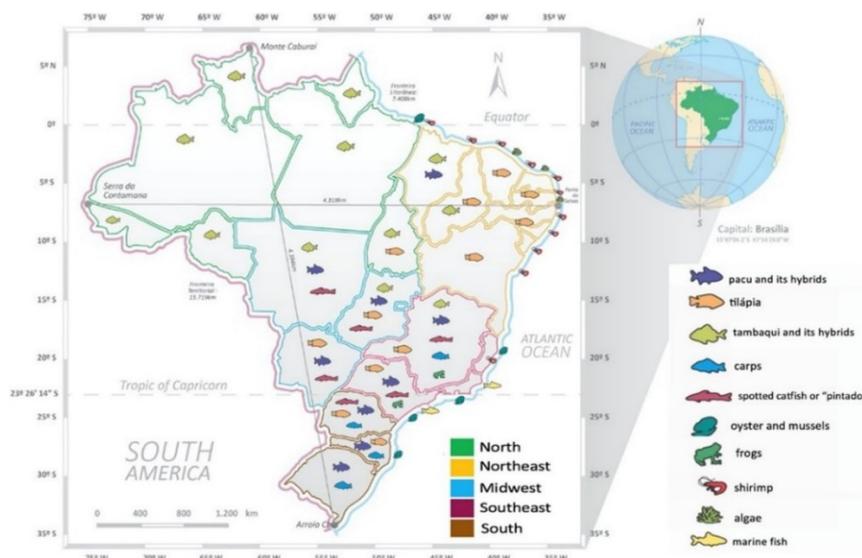
A cadeia produtiva brasileira baseia-se em cinco grupos principais: peixes de água doce (incluindo diversas espécies), camarões de água doce (*Macrobrachium rosenbergii*), rãs (*Lithobates catesbeianus*), camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) e moluscos bivalves marinhos (mexilhões, ostras e vieiras). Além dessas espécies, também são cultivados em menor escala: tartarugas (*Podocnemis spp*), crocodilo (*Caiman crocodiles*), peixes marinhos (*Rachycentron canadum*, *Epinephelus marginatus* e 25 espécies ornamentais), invertebrados marinhos (aproximadamente 100 espécies de corais ornamentais e o microcrustáceo *Artemia*

franciscana), macroalgas (*Porphyra spp*, *Hypnea spp*, *Gracilaria spp*), microalgas (*Spirulina* e *Arthrospira platensis*) e salicórnia (*Sarcocornia ambigua*).

A atividade é amplamente realizada em todo o território brasileiro (Fig. 2). A piscicultura continental é a única atividade presente em todos os estados. A carcinicultura de água doce é praticada em 19 estados, abrangendo todas as regiões do Brasil. Por outro lado, a carcinicultura marinha se concentra principalmente nos estados do Nordeste. A produção de moluscos bivalves está presente em todos os 17 estados costeiros, com ênfase na região Sul. Em contraste, a ranicultura está restrita a região sudeste do Brasil (VALENTI *et al.*, 2021).

Atualmente, a produção aquícola no Brasil é predominantemente destinada para o consumo humano, atendendo ao grande mercado interno. No entanto, outros nichos de mercado têm sido desenvolvidos nos últimos anos, incluindo a produção de iscas, pesque-pague, espécies ornamentais e a produção de juvenis para o abastecimento de lagoas recreativas particulares, bem como o repovoamento em reservatórios hidrelétricos (VALENTI *et al.*, 2021).

Figura 2. Distribuição dos principais grupos de espécies cultivadas em cada estado brasileiro.



Fonte: Valenti et al. (2021)

1.2.2. A Maricultura em Santa Catarina: Um mar de oportunidades

A maricultura é uma atividade consolidada em Santa Catarina. A implantação dos primeiros cultivos marinhos comerciais no estado iniciou em 1898. A partir de 2003, iniciaram-se os primeiros instrumentos legais, orientando sobre a obtenção de cessões de uso de águas da união para fins de aquicultura e a elaboração dos planos locais de desenvolvimento da maricultura (PLDM/SC) (SUPLICY *et al.*, 2017). Atualmente, o estado possui 837 áreas

aquícolas demarcadas e regularizadas no litoral catarinense, situadas de Palhoça até São Francisco do Sul (SUPLICY *et al.*, 2017).

As condições oceanográficas favoráveis de Santa Catarina, como a qualidade de água e a temperatura, são fatores-chave para o desenvolvimento do cultivo de moluscos, incluindo o mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758), ostras do Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), ostras nativas *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) e vieiras *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758). Atualmente, o estado possui 478 fazendas marinhas de moluscos bivalves credenciadas distribuídas entre os municípios de Palhoça, Florianópolis, Governador Celso Ramos, Penha e Bombinhas.

Neste contexto de sucessos na maricultura catarinense, é importante ressaltar a sólida colaboração entre o setor produtivo, a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e a EPAGRI. No que se refere aos bivalves, o Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM/UFSC) desempenha papel central no fornecimento de sementes de ostras *C. gigas* para toda a cadeia produtiva (ANDRADE, 2016). Além disso, essa colaboração tem se dedicado ao desenvolvimento de tecnologias para o cultivo de diversas espécies aquáticas, incluindo a amêijoia (*Anomalocardia brasiliiana*), amêijoia branca (*Amarilladesma mactroides*) e a ostra perlífera (*Pteria hirundo*) (VALENTI *et al.*, 2016).

No âmbito das algas, o cultivo de macroalgas *Kappaphycus alvarezii* também tem sido desenvolvido pelos maricultores e representa uma nova atividade promissora para Santa Catarina. O estado obteve a autorização ambiental para cultivo de *K. alvarezii* em 2020, e registrou a primeira safra comercial no estado em 2021/2022, com uma produção de 100 toneladas (SANTA CATARINA, 2023).

1.2.3. Crescimento populacional urbano, saneamento básico e a poluição aquática em Santa Catarina

Santa Catarina (SC), localizado na região sul do Brasil (25°57 'S, 48°19' W), é o 11° estado mais populoso e possui o 3° maior índice de desenvolvimento humano (IDH) do país (IBGE, 2023). A economia diversificada do estado está distribuída em polos regionais, abrangendo os setores tecnológicos, moveleiro, metalúrgico, de produção de alimentos, papel e celulose, vestuário, têxtil, plásticos, carbonífero, cerâmica, portuária, naval. Além disso, o turismo é um setor robusto na economia catarinense (SANTA CATARINA, 2022).

De acordo com o Censo Demográfico realizado em 2022, Santa Catarina ocupa o 2° lugar no ranking nacional de crescimento populacional em números absolutos, representando um aumento estimado em 21,78% (1,3 milhão de habitantes) em relação a 2010. Esse

crescimento está diretamente associado ao acentuado processo de litoralização em Santa Catarina, com destaque nas regiões do extremo norte e sul do estado (IBGE, 2022).

Embora seja uma das maiores economias do Brasil, o esgotamento sanitário é um dos desafios para o estado Santa Catarina, sendo classificado como um dos piores no tratamento de esgoto em nível nacional. Segundo o Instituto Trata Brasil, 90,4% da população catarinense possui acesso à água, entretanto apenas 26,1% tem acesso à coleta de esgoto, sendo que apenas 31,3% desse esgoto é tratado (disponível em:). Essa situação se agrava durante a alta temporada de turismo no verão, quando a população nas áreas litorâneas aumenta consideravelmente.

Estudos recentes no litoral catarinense identificaram a presença de vírus (MORTARI *et al.*, 2022), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PESSATI *et al.*, 2016; BASTOLLA *et al.*, 2022), produtos farmacêuticos e drogas ilícitas (PISETTA *et al.*, 2022; BOSCH-OREA *et al.*, 2023), metais (FERREIRA *et al.*, 2019), microplásticos (SERRANO *et al.*, 2022), pesticidas (CARMO *et al.*, 2020) em diferentes matrizes ambientais, evidenciando o precário saneamento básico como um problema de saúde pública, ambiental e econômico.

A maricultura e a pesca são susceptíveis aos efeitos da poluição resultante das atividades humanas que ocorrem no entorno das regiões costeiras. De acordo com a classificação dos corpos d'água estabelecida na Resolução CONAMA n° 357/2005 (CONAMA n° 357, 2005), a pesca e aquicultura se enquadram na classe 1 (águas salobras e salinas, respectivamente) e são concomitantes a atividades como recreação de contato primário, proteção das comunidades aquáticas, abastecimento para consumo humano (após tratamento convencional ou avançado) e irrigação (hortaliças, frutas parques, jardins, campos de esporte e lazer).

Diante desse cenário de poluição aquática, Santa Catarina destaca-se como o único estado brasileiro que realiza monitoramento periódico em áreas de cultivo de bivalves, com ênfase na contaminação microbiológica (coliformes termotolerantes, como *Escherichia coli*) e biotoxinas marinhas provenientes de fitoplâncton (BRASIL, 2012), conforme descrito pelo Plano Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB). Esse monitoramento estabelece os padrões baseados nas concentrações de organismos indicadores fecais (FIOs) nos tecidos moles de moluscos bivalves. Além disso, avaliações qualitativas e quantitativas de biotoxinas são realizadas em amostras de água do mar e bivalves (FONTANA *et al.*, 2020). No entanto, essa abordagem não contempla a avaliação de contaminantes químicos.

Neste contexto, em setembro de 2023 foi publicada a Portaria SDA/MAPA n°884/2023 aprovando o Programa Nacional de Moluscos Bivalves Seguros (MoluBiS), que substituirá o atual PNCMB. O MoluBiS ampliou o escopo de análises realizadas nos moluscos bivalves,

incluindo contaminantes inorgânicos (cádmio, chumbo, mercúrio) e HPAs (benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno e criseno) (Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/programa-nacional-de-moluscos-bivalves-seguros-e-implementado> Acesso em 09/11/2023).

A implementação desses mecanismos regulatórios, embora limitados diante da diversidade de contaminantes químicos em efluentes indústrias e domésticos, representa um avanço significativo para a segurança alimentar, monitoramento dos ambientes de costeiros e para a maricultura catarinense.

1.2.4. Efeitos dos contaminantes antropogênicos em moluscos bivalves

A ocorrência de contaminantes persistentes e emergentes nos ambientes aquáticos representa uma ameaça à biodiversidade e à integridade dos organismos aquáticos. Embora exista uma limitação na literatura em relação ao número de estudos sobre os mecanismos de toxicidade e efeitos biológicos em invertebrados marinhos, em comparação com peixes, trabalhos anteriores evidenciam diversos impactos, incluindo desordens locomotoras, efeitos teratogênicos, alterações no sistema imunológico, deformações corporais, desregulação endócrina, estresse oxidativo, genotoxicidade, e alterações na condição corporal (Tabela 1).

Tabela 1. Levantamento bibliográfico dos principais efeitos biológicos em moluscos bivalves relacionados a diferentes classes de contaminantes persistentes e emergentes descritos na literatura.

Composto	Classe	Concentração	Espécie	Resposta	Ref
Fenantreno	HPAs	0,02 e 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	<i>C. gigas</i>	↓ frequência do desenvolvimento normal e no tamanho da concha ↑ genes envolvidos biotransformação, sistema imunológico, crescimento tecidual e formação de concha	Nogueira et al (2017)
Benzo(a)pireno		0,38 e 3,8 $\mu\text{g L}^{-1}$	<i>Chlamys farreri</i>	Danos histopatológicos, Desregulação endócrina, Alterações na esteroidogênese em machos e fêmeas	Yang et al (2020 a, b)
Imidacloprida	Pesticidas	0,01, 0,1 e 1 mg L^{-1}	<i>Saccostrea glomerata</i>	↑ vias de biotransformação ↓ capacidade de defesa imunológica	Ewere et al (2020)
Diversos pesticidas (30 compostos)		Concentrações ambiental relevantes	<i>C. gigas</i> e mexilhões <i>M. edulis</i>	Estresse oxidativo Alterações em vias de biotransformação, estresse oxidativo, resposta imune e neurotoxicidade	Lerebours et al. (2023)
Diclofenaco	AINEs	200 ng L^{-1}	<i>P. perna</i>	Peroxidação lipídica, citotoxicidade, alterações na fertilização e desenvolvimento larval embrionário~	Fontes et al (2018)
Caféina e ácido salicílico		Diferentes doses	<i>M. galloprovincialis</i>	Peroxidação lipídica, neurotoxicidade colinérgica,	Marco et al (2022)
Cocaína, BE, anfetamina, MDMA, morfina	Drogas ilícitas	50 a 300 ng L^{-1}	<i>D. polymorpha</i>	Genotoxicidade	Parolini et al (2016)
Cocaína		0,2 e 2 $\mu\text{g L}^{-1}$	<i>P. perna</i>	Neurotoxicidade (↓AChE e COX) e desequilíbrios energéticos (↑DOPA, 5-HT; alterações no conteúdo de lipídios e transporte de elétrons mitocondriais)	Fontes et al (2022)
Oxitetraciclina	Antibiótico	1 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$	<i>M. galloprovincialis</i>	↓ estabilidade da membrana lisossomal ↑ Peroxidação lipídica Redução da glândula digestiva	Banni et al (2015)
17- α etinilestradiol	Hormônio	500 e 5000 ng L^{-1}	<i>M. galloprovincialis</i>	↓ Fertilização dos gametas	Capolupo et al (2018)

1.2.5. Sistemas de biotransformação de xenobióticos e defesa antioxidante

O processo de biotransformação de xenobióticos pode compreender três fases distintas. A fase I de biotransformação é predominantemente composta por monoxigenases, com destaque para a superfamília do Citocromo P450 (*CYP450*), que desempenham um papel crucial na metabolização de xenobióticos lipofílicos. Essas enzimas catalisam uma variedade de reações, incluindo oxidação, redução, hidrólise e epoxidação (GUENGERICH *et al.*, 2008). O principal objetivo da fase I é induzir modificações químicas nos grupos funcionais dos xenobióticos, resultando na bioativação dos compostos, formação de metabólitos com maior capacidade de excretabilidade ou conjugação com moléculas eletrofílicas endógenas na fase seguinte.

A fase II de biotransformação é essencial para diminuir a toxicidade de xenobióticos, tornando-os mais solúveis em água e facilitando sua excreção. As enzimas de conjugação, principalmente transferases, catalisam diversas reações como conjugação, sulfatação, metilação e acetilação (JANCOVA *et al.*, 2010). Em destaque, a superfamília da glutathione S-transferase (GST) apresenta uma variedade de classes e polimorfismos entre as diferentes frações celulares que são encontradas. Hayes *et al.* (2005) relatam a existência de sete classes citosólicas de GST (alpha, mu, pi theta, sigma, zeta e ômega), além das isoformas microsomal (kappa) e mitocondrial (MAPEG) em vertebrados. Em invertebrados, os estudos de classificação de GSTs ainda estão aumentando, especialmente em moluscos bivalves. Em vieiras *Chlamys farreri* foram identificadas 9 modalidades de GST, distribuídas em 6 classes (pi, sigma, rho, ômega, zeta e microsomal), podendo ser diferencialmente expressas entre os tecidos (YAO *et al.*, 2017). De acordo com os autores, essas diferenças podem indicar susceptibilidade ao dano oxidativo. Resultados similares vêm sendo descritos em ostras *Crassostrea* spp, sugerindo o envolvimento da classe ômega nos sistemas de defesa antioxidante, especialmente nas brânquias e glândula digestiva (BOUTET *et al.*, 2004; VODIASOVA *et al.*, 2021).

Por fim, os subprodutos resultantes da fase I e II podem ser transportados para o meio extracelular através de proteínas de membrana que compõem o sistema de resistência a múltiplos xenobióticos (MXR). Em organismos aquáticos, a proteína transmembrana P-glicoproteína (P-gp) desempenha esse papel, embora seus mecanismos regulatórios ainda sejam poucos compreendidos (BARD, 2000).

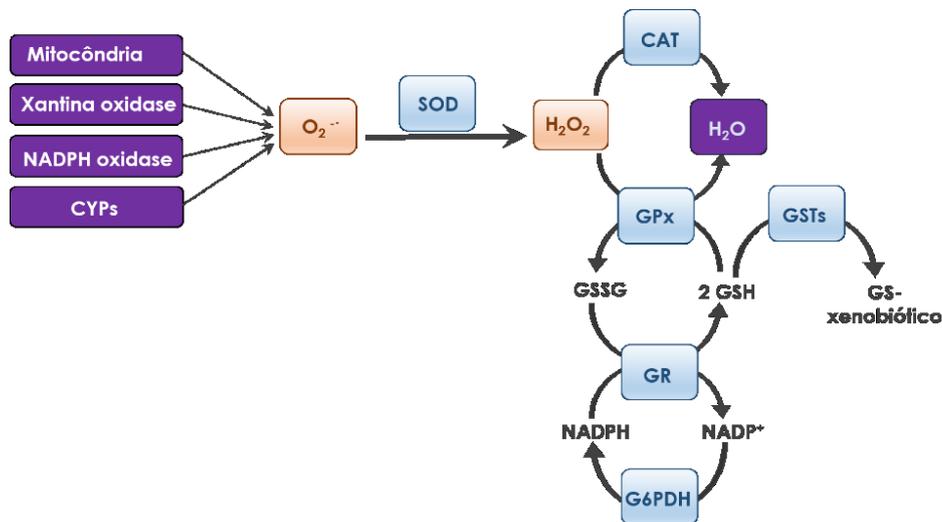
Dentre outros gatilhos, a biotransformação de xenobióticos pode induzir ao estresse oxidativo em organismos vivos. Estresse oxidativo é caracterizado pelo equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os sistemas de defesa antioxidante (enzimáticos e não-enzimáticos), resultando em danos oxidativos às biomoléculas (lipídios, proteínas e ácidos nucleicos) (SIES *et al.*, 2017). EROs podem ser classificadas em radicais livres, como ânion superóxido (O_2^-), e espécies não-radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Radicais livres, apresentam um ou mais elétrons não-pareados, tornando-os mais reativos e susceptíveis a causar danos celulares em comparação às espécies não-radicalares (LUSHCHAK, 2014).

EROs são produzidas naturalmente em diversas vias do metabolismo aeróbico, incluindo a fosforilação oxidativa, cadeia transportada de elétrons (mitocondrial e microsomal), atividade de enzimas oxido-redutases e em reações imunológicas (por exemplo, a fagocitose) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Entretanto, essa produção pode ser aumentar durante o processo de biotransformação de xenobióticos. Os organismos vivos

possuem um sistema de defesa antioxidante complexo e de vários níveis que atua tanto na eliminação das EROs quanto na minimização dos seus potenciais danos oxidativos, entre eles as enzimas antioxidantes (Fig. 4) (SIES et al., 2017).

Superóxido dismutase (SOD) representa um grupo de metaloenzimas amplamente distribuídas nas diferentes frações celulares, que catalisam as reações de dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 . A isoforma SOD-Mn está localizada nas mitocôndrias, enquanto a SOD-Cu/Zn (SOD1) é encontrada no citosol, cloroplastos e peroxissomos (REGOLI; GIULIANI, 2014). A catalase (CAT) desempenha papel fundamental na manutenção da homeostase redox nas células, catalisando a degradação de peróxido de hidrogênio em H_2O e oxigênio molecular. Similarmente, a glutathione peroxidase selênio-dependente (Se-GPx) também catalisa a degradação de peróxidos (orgânicos e inorgânicos), utilizando a GSH como cofator (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Figura 3. Principais vias de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e as enzimas dos sistemas de defesa antioxidante e de biotransformação.



Fonte: Bastolla (2017)

1.2.6. Monitoramento da poluição aquática: biomarcadores e moluscos bivalves como organismos bioindicadores

A maioria dos contaminantes antropogênicos são naturalmente lipofílicos, o que facilita a interação com a bicamada lipídica da membrana celular e a sua absorção. Dependendo de sua natureza química, os contaminantes podem passar por processos de biotransformação e/ou bioacumulação nos tecidos dos indivíduos (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A bioacumulação pode levar ao processo de biomagnificação, onde ocorre a transferência de substâncias xenobióticas para níveis mais elevados da cadeia trófica, resultando no aumento da concentração e dispersão dos poluentes tóxicos (GRAY, 2002). Portanto, é relevante realizar uma avaliação rápida dos seus efeitos deletérios no ecossistema. Neste contexto, a integração da avaliação químicas e de biomarcadores em espécies bioindicadoras, incluindo diferentes níveis de organização biológica, representa uma ferramenta fundamental para a avaliação precoce da qualidade ambiental (KUMARI; KHARE, 2017).

Os biomarcadores de contaminação são definidos como qualquer resposta biológica (molecular, bioquímica, fisiológica), resultante da exposição à contaminantes químicos, que demonstre alterações em relação ao estado normal ou basal dos indivíduos (WALKER *et al.*, 2016). Esses biomarcadores podem ser subdivididos em duas classes principais: 1) de exposição, incluindo as enzimas de biotransformação de xenobióticos e de defesa antioxidante, e 2) de efeito, como os marcadores de danos ao DNA, lipídios e proteínas (CAJARAVILLE *et al.*, 2020) (Tabela 2).

Espécies indicadoras são organismos cujo status reflete ou antecipa as condições ambientais, desempenhando um papel fundamental no monitoramento dos ecossistemas (SIDDIG *et al.*, 2016). De acordo com Beeby (2001), o termo sentinela se refere às espécies utilizadas para avaliação dos níveis de contaminantes químicos presentes nos ecossistemas, funcionando de maneira similar a um “bioacumulador”. Por outro lado, o termo monitor está associado a organismos que refletem os efeitos biológicos (fisiológicos, moleculares, bioquímicos) resultantes da exposição aos contaminantes presentes no ambiente (BEEBY, 2001).

Neste contexto, ostras do gênero *Crassostrea* (Fig. 4) têm sido amplamente empregadas como organismos bioindicadores em estudos ecotoxicológicos em todo o mundo, incluindo a avaliação de metais (FERREIRA *et al.*, 2019; AQUILINA-BECK *et al.*, 2023), HPAs (AGUIRRE-RUBÍ *et al.*, 2018; BASTOLLA *et al.*, 2022; COSTA *et al.*, 2023), PCBs (SANTOS *et al.*, 2020; FERREIRA *et al.*, 2021; UKWO *et al.*, 2023), pesticidas (MONCALEANO-NIÑO *et al.*, 2021; TALLEY *et al.*, 2022; CAPPARELLI *et al.*, 2023), compostos farmacêuticos (NOBRE *et al.*, 2020; EHRHART; GRANER, 2021; 2023), microplásticos (CHO *et al.*, 2021; SALDAÑA-SERRANO *et al.*, 2022; MLADINICH *et al.*, 2023), nanomateriais (ZHANG; WANG, 2023; MOTTIER *et al.*, 2023) e patógenos (KELLER *et al.*, 2019; UEKI *et al.*, 2021; LEUNG *et al.*, 2022).

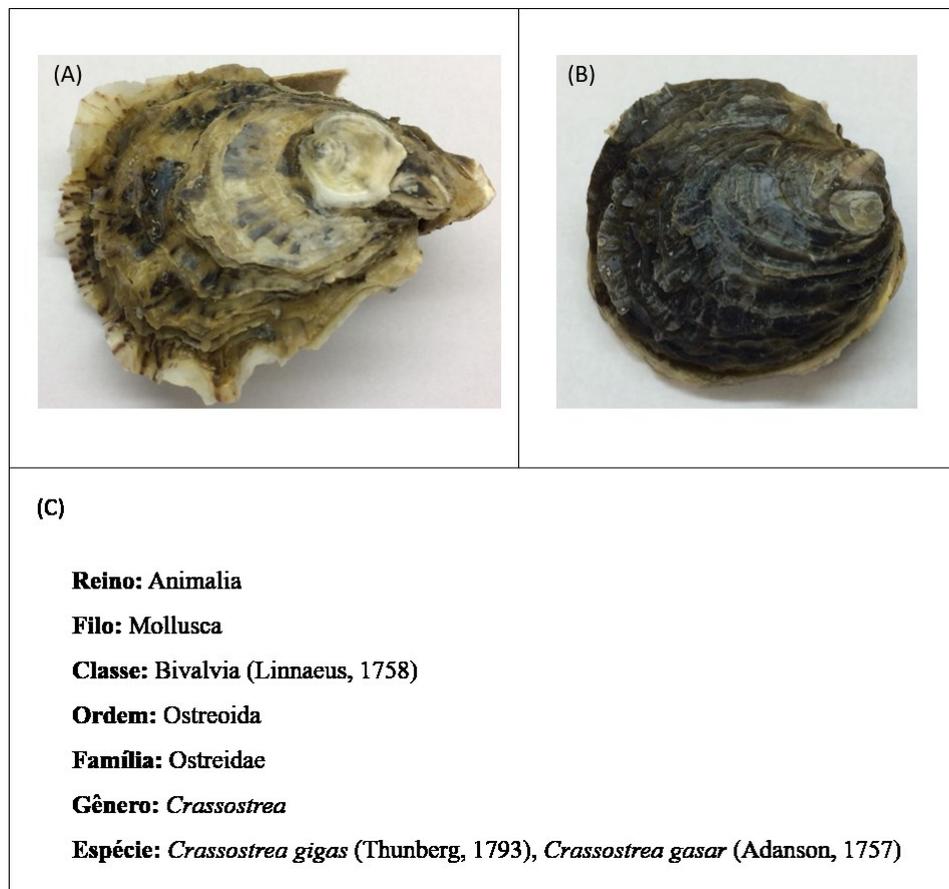
Embora existam relatos de diversas experiências bem sucedidas em programas de monitoramento semelhantes ao “*Mussel Watch*” (FARRINGTON *et al.*, 2016) em vários países

(CHOI *et al.*, 2010; MELWANI *et al.*, 2014; SPARKS *et al.*, 2014; RIOS *et al.*, 2016; BRIAND *et al.*, 2023; SANTOS-ECHEANDÍA *et al.*, 2021; KING *et al.*, 2023), ainda é crucial realizar mais estudos de biomonitoramento para avaliar concentrações ambientais, efeitos biológicos e desenvolver biomarcadores responsivos à diversidade de xenobióticos nos ecossistemas aquáticos.

Tabela 2. Principais biomarcadores de contaminação aquática empregados em estudos ecotoxicológicos com moluscos bivalves.

Categoria	Observação	Referência
<i>Biomarcadores de exposição</i>		
Citocromo P450 (<i>CYP1</i> , <i>CYP2AUI</i> , <i>CYP356A1</i>)	Indicador de exposição à contaminantes orgânicos como HPAs, PCBs, biotoxinas, compostos farmacêuticos, outros	Siebert <i>et al</i> (2017 a, b), Toledo <i>et al</i> (2008), Lüchmann <i>et al</i> (2014)
Glutationa S-Transferase (GST) (GST ômega, GST pi, MGST)		Lüchmann <i>et al</i> (2014), Yao <i>et al</i> (2017)
Colinesterases: acetilcolinesterase (AChE), Butirilcolinesterase (BChE) e Carboxilesterase (CbE)	Indicador de exposição à pesticidas organofosforados e carbamatos, além de toxinas e metais	Galloway <i>et al</i> (2002), Solé <i>et al</i> (2018)
Enzimas do sistema de defesa antioxidante: Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutationa Peroxidase (GPx)	Mecanismos de defesa para prevenir/minimizar o estresse oxidativo frente à diversos contaminantes (POPs e CEs)	Giuliani; Regoli (2014)
Vitelogenina (Vtg)	Indicador de exposição à compostos desreguladores endócrinos	Tran <i>et al</i> (2019)
Heat Shock Protein (HSP70)	Proteínas induzidas nos tecidos frente à estressoras ambientais ou químicos (HPAs, PCBs, metais, efluentes domésticos e industrial)	Mićović <i>et al</i> (2009)
<i>Biomarcadores de efeito</i>		
Malondialdeído (MDA)	Peroxidação lipídica resultante da exposição a contaminantes orgânicos (HPAs, PCBs, pesticidas, outros)	Almeida <i>et al</i> (2007)

Figura 4. Espécies de ostras avaliadas no presente estudo. (A) Ostras do Pacífico *C. gigas* (B) Ostras nativas *C. gasar*. (C) Classificação taxônômica das ostras.



Fonte: Acervo pessoal Bastolla, C. L.V.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Investigar as respostas de biomarcadores bioquímicos e moleculares envolvidos na biotransformação, neurotransmissão, estresse oxidativo, proteção ao choque térmico em ostras *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) e ostras nativas *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) resultantes da exposição a contaminantes persistentes e de preocupação emergente em duas situações distintas: 1) monitoramento em diferentes áreas do litoral do Estado de Santa Catarina, 2) experimentos de exposição em laboratório.

1.3.2 Objetivos específicos

Capítulo 1

- Apresentar uma revisão bibliográfica acerca dos temas envolvidos na tese

Capítulo 2

- Avaliar as alterações em nível transcricional de genes envolvidos na fase I (*CYP1A-like*, *CYP2-like*, *CYP2AUI-like* e *CYP356A1-like*) e II (*GSTO.4A-like*, *GSTA1A-like* e *SULT-like*) de biotransformação de xenobióticos e de estresse oxidativo (*SOD-like* e *CAT-like*) em brânquias de ostras *C. gigas* coletadas em áreas de cultivo da Grande Florianópolis (Santa Catarina, Brasil)
- Quantificar os níveis de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) nos tecidos moles das ostras coletadas em Santo Antônio de Lisboa, Sambaqui, Serraria, Caieira, Tapera e Imaruí
- Correlacionar os níveis de transcrição em ostras *C. gigas* em resposta aos diferentes níveis de poluição por esgoto sanitário nas baías norte e sul da Grande Florianópolis (Santa Catarina, Brasil)

Capítulo 3

- Investigar as respostas de genes e enzimas de biotransformação de fase I (*CYP1-like*, *CYP2AUI-like* e *CYP356A1-like*) e II (atividade GST, *GSTO-like* e *SULT-like*) defesa antioxidante (SOD, CAT, GPx) e neurotransmissão (AChE) em ostras nativas *C. gasar* coletadas em quatro regiões do litoral catarinense impactadas por poluição de origem antrópica
- Quantificar os níveis contaminantes persistentes (HPAs, PCBs e pesticidas) e emergentes (antibióticos, desreguladores endócrinos e anti-inflamatórios não-esteroidais) em ostras coletadas em São Francisco do Sul, Itajaí, Florianópolis e Laguna
- Determinar os níveis de expressão de HSP70, através de ensaios de imunodeteção por *western blotting*, em brânquias de ostras *C. gasar*
- Analisar os níveis de peroxidação lipídica nas brânquias das ostras
- Correlacionar as respostas dos biomarcadores aos níveis de contaminantes ambientais e à influência dos parâmetros ambientais
- Estabelecer um *baseline* das concentrações ambientais de contaminantes nas regiões costeiras de Santa Catarina

Capítulo 4

- Investigar as alterações transcricionais de biotransformação de fase I (*CYP1A-like*, *CYP356A1-like*, *CbE4A-like*, *CbE5A-like*), neurotransmissão (*5HT-like*, *DOP2R-*

like) e estresse oxidativo (*SOD-like*, *CAT-like*) em brânquias de ostras *C. gigas* expostas a duas concentrações ambientais de cocaína (COC) durante 24h

- Avaliar as respostas bioquímicas de GST e EROD em brânquias das ostras expostas a duas concentrações de COC durante 24h
- Quantificar as enzimas envolvidas na defesa antioxidante (SOD, CAT, GPx, GR, G6PDH) e os níveis de peroxidação lipídica em ostras expostas à COC durante 96h
- Discutir sobre as respostas dos biomarcadores avaliados e seus potenciais efeitos em vias metabólicas e fisiológicas em ostras *C. gigas* expostas a COC

Capítulo 5

- Conclusões e comentários finais dos resultados obtidos na tese e perspectivas gerais para estudos ecotoxicológicos futuros.

CAPÍTULO II

2. Molecular responses in oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) from aquaculture areas of Santa Catarina Island bays (Florianópolis, Brazil) reveal anthropogenic effects.

*Camila L. V. Bastolla*¹; *Miguel Saldaña Serrano*¹; *Daina Lima*¹; *Jacó J. Mattos*²; *Carlos H. A. M. Gomes*³; *Herculano Cella*⁵; *Bárbara P. H. Righetti*¹; *Clarissa P. Ferreira*⁶; *Flávia L. Zacchi*¹; *Márcia C. Bicego*⁴; *Satie Taniguchi*⁴; *Afonso C. D. Bairy*^{1*}

¹ Laboratory of Biomarkers of Aquatic Contamination and Immunochemistry (LABCAI), Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

² Aquaculture Pathology Research Center, NEPAQ, Federal University of Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

³ Laboratory of Marine Mollusks (LMM), Department of Aquaculture, Center of Agricultural Science, Federal University of Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

⁴ Laboratory of Marine Organic Chemistry, Oceanographic Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁵ Laboratory of Algae Cultivation, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

⁶ Fishery Engineering and Biological Sciences Department, Santa Catarina State University, Laguna, 88790-000, Brazil

Capítulo publicado na revista *Chemosphere*, v. 307, p. 135735 (QUALIS -1, IF: 8.943)

Part of special issue: “SI: CICTA2021 Conference: Advances in environmental toxicology in the face of emerging challenges from global contamination”

DOI: doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135735

2.1 Abstract

Anthropogenic activities in coastal regions cause risks to the environmental and human health. Due to the carcinogenic and mutagenic potential, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are considered priority for monitoring. Most of the Brazilian production of *Crassostrea gigas* oysters are placed in the Bays of Santa Catarina Island. The aim of this study was to evaluate molecular responses (phase I and II of biotransformation and antioxidant defense) of *C. gigas* from six oyster farming areas potentially contaminated by sanitary sewage in Florianópolis Metropolitan (SC, Brazil): Santo Antônio de Lisboa, Sambaqui, Serraria, Caieira, Tapera, Imaruim. We evaluated the transcript levels of *CYP1A1-like*, *CYP2-like*, *CYP2AU2-like*, *CYP356A1*, *GSTA1A-like*, *GSTO.4A-like*, *SULT-like*, *SOD-like* and *CAT-like* by qRT-PCR. Only oysters from Caieira showed levels of thermotolerant coliforms allowed by the law. Chemicals analyzes in soft tissues of oysters showed low to average levels of PAH in all monitored areas. Enhanced transcript levels of phase I (*CYP1A1-like*, *CYP356A1-like*, *CYP2-like* and *CYP2AU2-like*) were observed in oysters from Serraria and Imaruí, suggesting higher biotransformation activity in these farming areas. Regarding phase II of biotransformation, *GSTO.4A-like* was up-regulated in oysters from Imaruí compared to Caieira and Santo Antônio de Lisboa. An upregulation of *SOD-like* and *CAT-like* were observed in oysters from Imaruí and Serraria, suggesting that oysters from these sites are facing higher prooxidant conditions compared to other areas. By integrating the biological and chemical data it is suggested that human-derived contaminants are affecting the oyster metabolism in some farming areas.

Key-words: Biomonitoring, Biomarker, Oxidative stress, Cytochrome P450, PAHs, Aquaculture.

2.2 Introduction

Anthropogenic activities are a major contributor to the environmental changes observed in the geologically recent time, described as the Anthropocene (Lewis and Maslin, 2015). The disordered urbanization is an accelerator in many of these processes (Elmqvist et al., 2021) that include local climate changes (Salerno et al., 2018), decreased ecosystem services (Lyu et al., 2018) and increased water pollution (Cerqueira et al., 2019). Besides, coastal zones are highly populated compared to inland zones, therefore more susceptible to the impact caused by human activities, such as fishing, industry, transportation, and tourism (Barragán and Andrés, 2015). Furthermore, there is a trend that the migration towards the coast will continue in the future (Neumann et al., 2015).

Florianópolis Island (27°S, 48°W) (Southern Brazil) has a territory formed by a large oceanic island and a small continental peninsula, which attracts tourists from all over the world (Ministério do Turismo, 2019). São José and Palhoça are neighbouring cities and comprise the Florianópolis Metropolitan area, that together with Florianópolis, possess more than 900,000 residents (IBGE, 2021). However, in the summer tourism season, the population can duplicate (Backes, 2016). Besides tourism, there are several activities around the north and south bays of Santa Catarina Island (BSCI), such as industries, livestock farming, small-scale agriculture, and fisheries (Fonseca et al., 2021). Mariculture is also an important economic activity in BSCI, and this region leads Brazilian bivalve farming production, with oysters and mussels representing 70% of the national production (Suplicy, 2018). Among them, the Pacific oyster *Crassostrea gigas* is the most cultivated species in the BSCI, with Florianópolis, São José and Palhoça producing 1433 tons, 526 tons, and 85 tons, respectively, thus being responsible for 96% of the total cultivated oysters in the state (EPAGRI, 2017).

Discharges of domestic and industrial effluents into marine environments is a common practice and is allowed according to the Brazilian legislation (CONAMA nº 430, 2011), as long as they are properly treated and show good quality standards within allowed limits. However, this practice can become problematic in regions where the sewage treatment system is inefficient or non-existent. Recent studies carried out in the BSCI reported a significant and positive correlation between thermotolerant coliforms (TC) levels and the resident human population, the population density, and urbanization percentage (Garbossa et al., 2017). Similarly, Rigotto et al. (2010) reported the presence of fecal indicator organisms (FIO) evidencing the presence of sanitary sewage discharges, which can also include nutrients, solids, pathogens, oil and greases, trace metals, plastics, and other toxic chemicals (Vikas and Dwarakish, 2015).

Different studies performed in BSCI have reported the presence of organic pollutants, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), total linear alkylbenzenes (LABs), dichlorodiphenyltrichloroethane (DTT), hexachlorocyclohexane (HC), and pesticides (Flores-Nunes et al, 2015, Souza et al, 2012, Souza et al, 2016, Zanette et al, 2008) in sediment and in soft tissue of bivalves. Aquatic organisms possess biotransformation systems to enhance the polarity of chemicals, through Phase I reactions, followed by conjugation of these metabolites with Phase II enzymes to increase excretion rates (Van der Oost et al., 2003). The superfamily Cytochrome P450 (*CYP450*) belongs to phase I systems and comprises a group of heme-enzymes that usually catalyze oxidative reactions, converting xenobiotics to potentially reactive products, which can be conjugated through the activity of phase II enzymes of biotransformation (Guengerich, 2001). The conjugation of either the parent compound or its metabolite occurs through binding to endogenous electrophilic molecules catalyzed mostly by transferase enzymes, such as Glutathione *S*-Transferase (*GST*) or Sulfotransferase (*SULT*) (Jancova et al., 2010).

Oxidative stress can occur during xenobiotic biotransformation, since reactive oxygen species (ROS) production can be enhanced, associated to CYP catalytic cycle and overwhelming the antioxidant defense system (Hrycay and Bandiera, 2015; Halliwell and Gutteridge, 2015). This process can compromise homeostasis and potentially leading to death (Lesser, 2006, Silvestre, 2020). To counteract, antioxidant enzymes such as Catalase (CAT) and Superoxide dismutase (*SOD*) are primary protective agents against ROS formation (Silvestre, 2020).

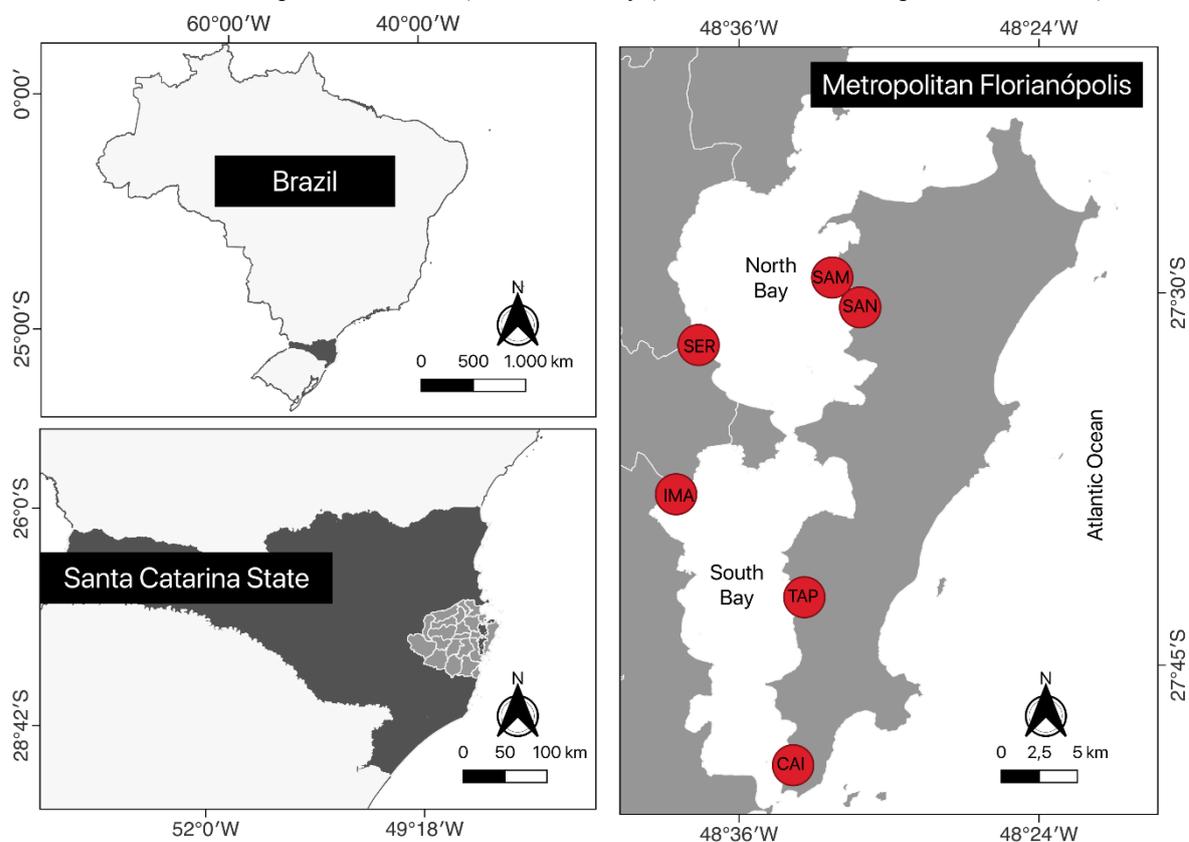
The aim of this study was to evaluate the transcript levels of genes involved in biotransformation (phase I and II) and antioxidant defenses in gills of oysters *C. gigas* sampled at six farming areas under influence of different levels of sanitary sewage discharges in North and South Bays of Florianópolis (Santa Catarina, Brazil), aiming to identify new tools as potential biomarkers of exposure. In addition, an Integrated Biomarker Response (IBR) and Principal Component Analysis (PCA) approach was carried out to diagnose oyster farming areas that show environmental disturbance and explore biological responses associated with levels of contaminants, respectively. This work is in accordance with the goals 6 and 14 for sustainable development of the United Nations, which aim for minimizing or mitigating the effects resulting from contaminants in aquatic environments.

2.3 Material and methods

2.3.1 Study area and animals collect

Florianópolis, capital of Santa Catarina state, is formed by a semi-enclosed body water divided into North and South bays, in the surrounding cities: Florianópolis, São José and Palhoça (Fig. 1) (Silveira and Bonetti, 2019). Immediately after the Brazilian carnival (February 28 and 29, 2020), six-month-old Pacific oysters *C. gigas* ($8.9 \text{ cm} \pm 4.7 \text{ cm}$) were collected ($n = 22$ oysters per area) in three farming areas in North Bay: Santo Antônio de Lisboa (SAL), Sambaqui (SAM), Serraria (SER, mainland), three areas in South Bay: Caieira (CAI), Tapera (TAP) and Imaruim (IMA, mainland) and were transported to laboratory. In the north bay, SAL ($-27^{\circ}51'04.2''\text{S}$, $-48^{\circ}51'96.7''\text{W}$) and SAM ($-27^{\circ}49'34.9''\text{S}$, $-48^{\circ}52'68.4''\text{W}$) are farming areas close to urban zones. SER ($-27^{\circ}32'08.1''\text{S}$, $-48^{\circ}37'38.6''\text{W}$) is placed in São José city, near to Biguaçu River, where is found an urban-industries concentration and agriculture activities, contributing to enhanced discharges of untreated sewage and pesticides. In the south bay, CAI ($-27^{\circ}81'81.8''\text{S}$, $-48^{\circ}56'50.1''\text{W}$) is also a mariculture zone, but with much lower urbanization. TAP ($-27^{\circ}70'40.3''\text{S}$, $-48^{\circ}55'95.7''\text{W}$) is among the most populated neighbourhoods in the south of Florianópolis. IMA ($-27^{\circ}63'57.1''$, $-48^{\circ}64'18.7''\text{W}$) is located near Imaruim Bridge and is directly affected by discharges of untreated sewage, agriculture and animal farming in the cities of São José and Palhoça. In laboratory, the oyster shell weight was subtracted from the total weight in order to obtain the tissues weight. Gill samples from ten oysters were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for molecular analysis.

Figure 1. Map of study sites (A) Brazil map and detailed location of Santa Catarina (Southern Brazil), (B) Map of Santa Catarina state with detailed location of 40 cities that compose Florianópolis metropolitan area, (C) Studies sites of the Bays of Santa Catarina Island (BSCI) and detailed location of sites in North Bay (SAL: Santo Antônio de Lisboa, SAM: Sambaqui, SER: Serraria) and South Bay (CAI: Caieira, TAP: Tapera, IMA: Imaruí).



2.3.2 Water quality parameter and physicochemical analysis

A single surface water sample per site (SAL, SAM, SER, CAI, TAP and IMA) was collected using a Van Dorn bottle (1 L). The levels of total coliforms (method SM 9221 B), thermotolerant coliforms (method SM 9221 E), detergent (method SM 5540 C), total phosphorus (method SM 4500-P E), total nitrogen (method SM 4500 N C), oil and grease (perceptible) and total suspended solids (method SM 2540 D) were analyzed, according the Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater (Rice et al., 2012). At the time of collection dissolved oxygen, salinity, air temperature, water temperature, conductivity and pH were recorded using multiparameter equipment (Akso Measure Instruments, model AK88).

2.3.3 Bioaccumulation of PAH in soft tissues of *C. gigas* oysters

Twelve oysters (pools of 4 oysters in triplicate) were collected in each site and frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for the subsequent analysis of 16 priority PAHs, according to the US Environmental Protection Agency (US EPA) (US EPA, 1986). Samples were freeze-dried for 72 h (Thermo Savant, module D), followed by homogenization with pestle. A Soxhlet-extraction in oysters

(5 g) was performed based on MacLeod et al. (1986), with minor modification, using a 50% mixture of residue grade *n*-hexane and dichloromethane for 8 h. In sequence, were added to the samples, blanks and reference material from National Institute of Standards and Technology – NIST (SRM 2974) *n*-hexadecene, *n*-eicosene, naphthalene-d8, acenaphthene-d10, phenanthrene-d10, chrysene-d12, and perylene-d12 as surrogates. The fractionation of hydrocarbon extracts was performed as F2 (PAHs) using silica gel-alumina column chromatography. Gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) was used to determinate aliphatic hydrocarbons. The PAH analysis was performed by an Agilent 6890 gas chromatograph coupled to a 5973 N mass spectrometer (GC/MS) in a selected ion mode (SIM). Quantifications were performed using an analytical curve built with certified standards at five different concentrations. In addition, the mass/charge ratio (*m/z*) of the individual quantitation ion was also considered for PAH identification.

2.3.4 Primer design

The sequences used for designing the primers in *C. gigas* oysters were obtained from the genome carried out by Zhang et al. (2012). Oligonucleotides for qPCR were designed and analyzed using the software PrimerQuest Tool (<http://www.idtdna.com>). The genes quantified in the present study were: Cytochrome P450 isoforms (*CYP1A1-like*, *CYP2-like*, *CYP2A2-like* and *CYP356A1*), Glutathione-S-Transferase isoforms (*GSTA1A-like* and *GSTO.4A-like*), Sulfotransferase (*SULT-like*), Superoxide Dismutase (*SOD-like*) and Catalase (*CAT-like*) (Supplementary Table 1).

2.3.5 Total RNA isolation and cDNA synthesis by reverse transcription

Extraction of the total RNA was performed from 80 mg of gill samples (*n* = 10 oysters), using 1 mL of the Qiazol reagent (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions with modifications. The concentration and purity of total RNA were quantified in a NanoDrop®ND-1000 spectrometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). The cDNA synthesis was performed using QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen), according to manufacturer's instructions. In sequence, the synthesized cDNA was diluted for the runs and stored in a –20 °C freezer.

2.3.6 Quantitative PCR analysis

Each real-time reaction was performed from 100 ng cDNA and 1 μ M of each primer (forward and reverse, respectively). The mRNA level evaluation was performed by the kit QuantiFast SYBR Green PCR (Qiagen) and quantified using the Rotor-Gene Q thermocycler (Qiagen). The PCR product was analyzed and submitted to melting analysis. The efficiency of the reaction (E) was determined for each pair of primers and confirmed through the cDNA calibration curve. All curves showed a correlation coefficient above 0.99 and efficiency between 95 and 105%. Normalization for each target gene was performed according to Rhinn et al. (2008), based on the cDNA concentration present in the samples. All data were calibrated by the mRNA levels of oysters from CAI and the results were analyzed by the 2^{-cq} method (Schmittgen and Livak, 2008).

2.3.7 Integrated Biomarker Response (IBR)

Transcription levels of biotransformation and antioxidant-related genes were used to calculate the Integrated Biomarker Response version 2 (IBRv2), as described by Beliaeff and Burgeot (2002) and adapted by Sanchez et al. (2013), where the deviation from the reference group indicates a disturbed or undisturbed state (Sanchez et al., 2013). The deviation between biomarkers of aquaculture areas (SAL, SAM, SER, TAP and IMA) were compared to CAI (reference site).

2.3.8 Statistical analysis

Statistics analysis were carried using GraphPad Prism® software version 7.00. The transcript levels data were shown as mean \pm standard deviation. The presence of outliers was verified in the data according to the Grubbs test. The normality (Shapiro-Wilk) and homoscedasticity (Bartlett) of the data were tested, and then One-way ANOVA followed Tukey's posttest (level of significance $p < 0.05$) were applied. The Integrated Biomarker Response Index (IBR) calculation was based on Sanchez et al. (2013). A Principal component analysis (PCA) was conducted using R i386 version 4.1.2 and performed to explore the relationship between PAHs (total and isolated) and the molecular responses. Gene normalization, PCA and IBR were performed using CAI as reference group due the lower levels of thermotolerant coliforms in water and PAH concentrations in oysters from this site.

2.4 Results and discussion

2.4.1 Water quality parameters

Total suspended solids, detergents, nitrogen, and total phosphorus concentrations in seawater samples were similar among all sites (Table 1). Higher levels of thermotolerant coliforms were observed in IMA > SER > TAP indicating proximity to sanitary sewage discharges. According to the Brazilian legislation, the geometric mean of concentration for thermotolerant coliforms in marine waters intended for aquaculture (class type I) cannot exceed 43 MPN (more probable number) per 100 mL at 15 samples (CONAMA nº 357, 2005). The presence of bacteria, generally, such as *Escherichia coli* is a traditional indicator of fecal pollution from sewage discharges (Farkas et al., 2020). However, sources such as agriculture livestock also may contribute to environmental concentrations of *E. coli* (Campos et al, 2013a, Campos, 2013b). In this context, higher levels of fecal indicator organisms (FIO) (*E. coli*, *Enterococci*, noroviruses, human adenovirus) were reported in the surroundings of the monitored areas of BSCI, corroborating the findings observed in the present study (Moresco et al, 2012, Rigotto et al, 2010, Souza et al, 2012, Souza et al, 2018). The scenario shows an ineffectiveness of sewage collection and treatment systems which covers only approximately 40% of the whole area (SNSA/MCIDADES, 2014, SNSA, 2016), and fail to reduce the FIO inputs to the marine environment (Garbossa et al., 2017). Previous studies reported a relationship between viral pollution and chemical contaminants in bivalves. According to Fiorito et al. (2019) there was a correlation between chemical (PAHs, cadmium, PCBs) and viral contamination in 62% of mussels *M. galloprovincialis* collected at three different aquaculture farming in Italy (Campania region). A recent field survey carried out by the same research group observed that oysters with the highest pollutant concentration were simultaneously positive for the presence of viruses, and suggested *C. gigas* as a good model for correlating chemical and viral contamination (Fiorito et al., 2021).

Table 1. Water quality parameters in aquaculture areas of monitoring.

Parameters	Units	NORTH BAY			SOUTH BAY		
		SAL	SAM	SER	CAI	TAP	IMA
Dissolved Oxygen	mg/L	7.2	7.0	7.2	7.8	6.0	8.5
Salinity	ppm	37.9	38.3	38.3	38.2	35.3	36
Conductivity	ms/msc	55.2	55	55.7	55.5	55.6	52.6
Air temperature	°C	26	26	30	26	26	28
Water temperature	°C	24.2	23.8	24.8	21.8	22.7	25.8
pH		8.12	8.09	8.26	8.4	8.26	8.16
Total Coliforms	(NPM/100mL)	130	130	2,400	20	1,400	3,500
Thermotolerant Coliforms	(NPM/100mL)	78	45	1,300	absent	1,100	2,400
Detergent	mg/L	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10
Total phosphorus	mg/L	<0.0014	<0.0014	<0.0014	<0.0014	<0.0014	<0.0014
Total Nitrogen	mg/L	1.79	2.16	4.06	1.64	2.34	4.88
Oil and Grease	mg/L	absent	Absent	absent	absent	absent	absent
Total suspended solids	mg/L	49.5	69	47	43.5	44	38

2.4.2 Levels of PAH in soft tissues of *C. gigas* oysters

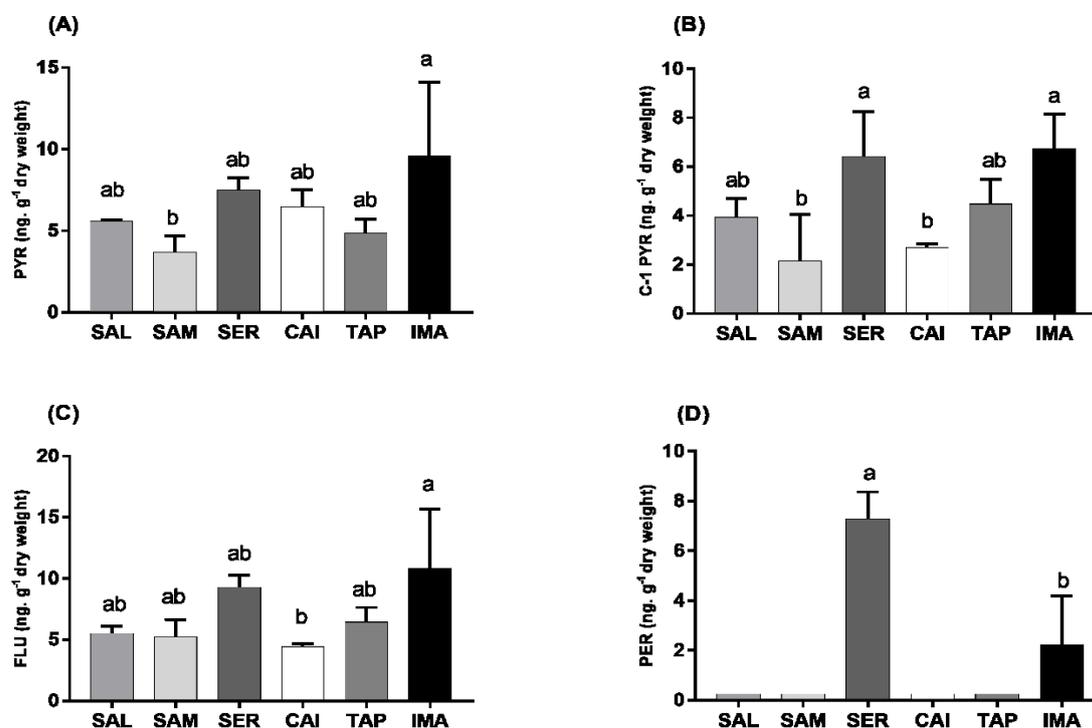
PAH shows persistence and ubiquitous occurrence in the environment (Abdel-Shafy and Mansour, 2016). PAHs' bioaccumulation can elicit toxicity to organisms (Gao et al, 2018, Sun et al, 2021a, Sun et al, 2021b), being then classified as priority for monitoring by the US EPA (US EPA, 1986) and the European Commission (Commission Regulation 1881/2006, 2006).

Quantifiable levels of PAHs' were observed in soft tissues of oysters collected in all selected farming areas and the results are presented in Supplementary Fig. 1 and Supplementary Table 2. No significant differences were observed in the total PAH concentration (Σ PAH) in soft tissues of oysters collected in these sites, possibly due to the small sample number ($n = 3$). The PAH concentrations ranged from 37 to 114 ng g⁻¹ dry weight of soft tissue, with the highest concentrations observed in IMA (114 ng g⁻¹ dry weight) and SER (83 ng g⁻¹ dry weight), respectively. Lower levels of PAHs were found in TAP (37 ng g⁻¹ dry weight), SAM (43.8 ng g⁻¹ dry weight), CAI (44.7 ng g⁻¹ dry weight) and SAL (54 ng g⁻¹ dry weight). These results corroborate with the higher levels of thermotolerant coliforms observed in IMA and SER, and indicate input to sanitary sewage compared to other farming areas. Similar concentrations of

PAHs, excluding SER and IMA, were reported in oysters (native and transplanted) from areas close to petrochemical complex, oil refinery (Martins et al., 2020) and harbor such as Todos os Santos and Paranaguá Bays, respectively in Bahia and Paraná states in Brazil (Torres et al., 2012). In a previous work, Zacchi et al. (2018) reported lower PAH contamination (Σ PAH concentration range from 7.2 to 17.5 ng g⁻¹ dry weight) in oysters from three farming areas of Babitonga and Guaratuba (Southern, Brazil) compared to our study.

According to Baumard et al. (1988), the concentrations of Σ PAH ranging from 0 to 100 ng g⁻¹ were typical of areas with low a moderate levels of PAH contamination, in accordance with findings observed in the present study. Otherwise, higher concentrations were observed in farming areas near to urbanized regions in Brazil such as BSCI (*C. gigas*, range from 19–1594 ng g⁻¹ dry weight) (Souza et al., 2012; Flores-Nunes et al., 2015), Laguna Estuarine System (*Crassostrea gasar*, range from 407–1976 ng g⁻¹ dry weight) (Ferreira et al., 2020, Ferreira et al., 2021) and worldwide as Guangdong-China (*Crassostrea rivularis*, range from 231–1178 ng g⁻¹ dry weight) (Yu et al., 2016), Lake Guchenghu-China (surface waters, 410–1160 ng L⁻¹) (Zeng et al., 2018). Of the 16 priority PAHs' monitored in the present study (Supplementary Table 2), 3 of them showed a significant difference between the areas (Fig. 2). Oysters from IMA showed 2.6-fold higher levels of pyrene (PYR) (9.6 ng g⁻¹ dry weight) (Fig. 2A) in relation to SAM (3.7 ng g⁻¹ dry weight). In the same farming area 2.4-fold higher levels of fluoranthene (FLA) (10.8 ng g⁻¹ dry weight) (Fig. 2C) were observed in relation to oysters sampled at CAI (4.4 ng g⁻¹ dry weight). Similar concentrations for PYR and FLA were reported in *Mytilus* spp. from European Coastal (Olenycz et al., 2015). Oysters from SER had 3-fold higher levels of perylene (PER) (7.3 ng g⁻¹ dry weight) in comparison to IMA (2.2 ng g⁻¹ dry weight) (Fig. 2D). Among the alkylated PAH, significantly higher levels of C1-pyrene were observed in organisms from IMA (6.7 ng g⁻¹ dry weight) and SER (6.4 ng g⁻¹ dry weight) when compared to CAI (2.7 ng g⁻¹ dry weight) and SAM (2.1 ng g⁻¹ dry weight) (Fig. 2B).

Figure 2. Polycyclic aromatic hydrocarbon (A: Pyrene, B: C1-Pyrene, C: Fluoranthene, D: Perylene) concentrations (mean \pm standard deviation) in soft tissues of *C. gigas* oysters from six farming areas in North and South Bays of Santa Catarina Island (BSCI). The results are expressed in ng g^{-1} dry weight. Differences were considered significant when $p < 0.05$.



Detected concentrations of PYR, FLA and PER (5,4 and 5 compounds, respectively) in soft tissues of oysters can be related to their potential to bioaccumulate as persistence increases with increased molecular weight (Haritash and Kaushik, 2009). PYR and FLA have pyrogenic origin and their presence is mainly associated with anthropogenic inputs, such as incomplete combustion of fossil fuel, industrial production of dyes and pigments, agrochemicals and pharmaceuticals (Abdel-Shafy and Mansour, 2016). Otherwise, PER is the major biogenic PAH found in marine environments. Their presence is mainly related to degradation of diagenetic precursors (Venkatesan, 1998). The Biguaçu and Imaruim rivers contribute significantly to eutrophication in north and south bays of Florianópolis, respectively, due the increased pressure especially during touristic season (Cabral, 2020, Fonseca et al., 2021). According to Garbossa et al. (2017), BSCI showed a moderate-high (North Bay) to high (South Bay) susceptibility to eutrophication by urbanization, especially in the shoreline, that can affect the BSCI water quality and levels of contaminants in the central region of the bay (Souza et al, 2018). This hypothesis corroborates the results observed in present study and explained the higher levels of PAH in IMA and SER, respectively, in relation to other evaluated farming areas.

2.4.3 Transcription levels of genes involved in biotransformation and antioxidant systems

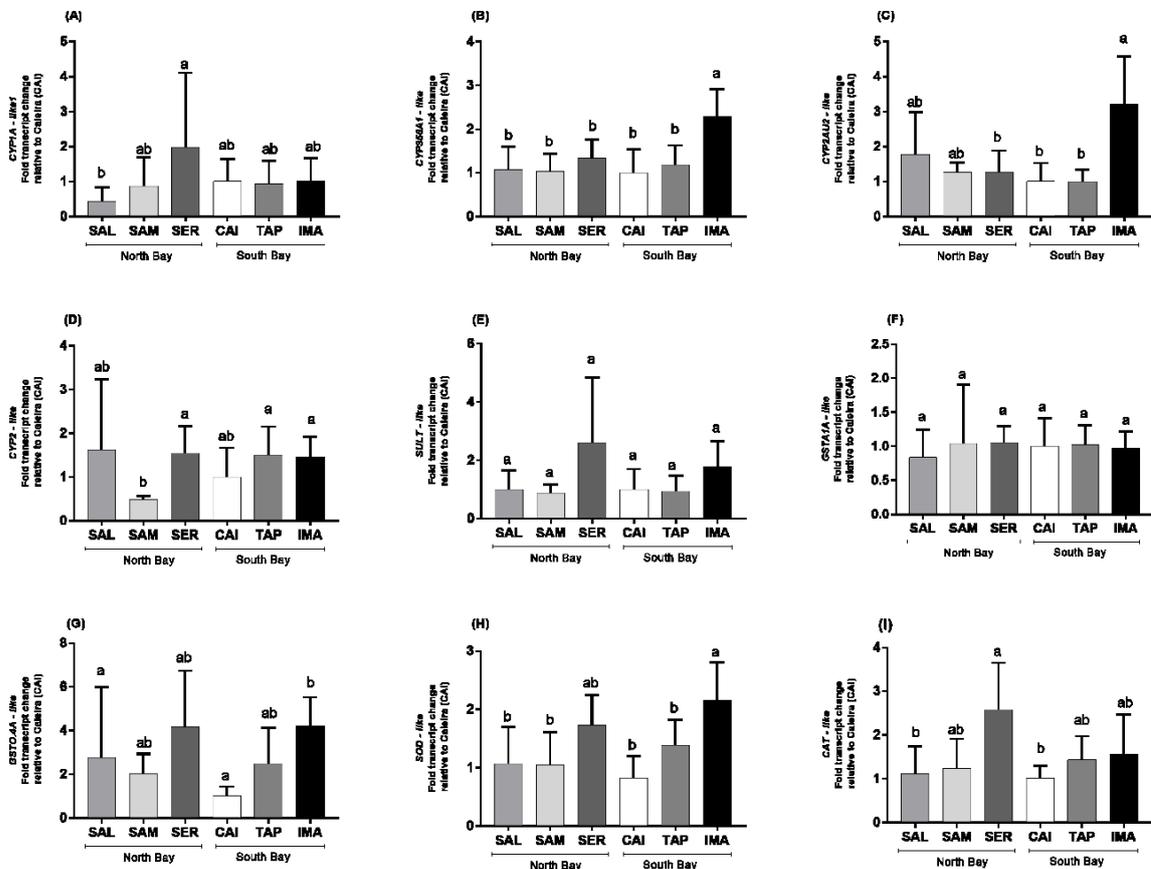
Molecular biomarkers are useful tools for biomonitoring because they reflect earlier changes in biological processes resulting from contaminant exposure. Furthermore, biotransformation systems in bivalves are not clearly elucidated, thus analysis of phase I and II coding genes could help to identify activation or inactivation of metabolic pathways that in some cases are limited by traditional biomarkers due the lower basal activity compared to other sentinel organisms (Schlenk and Buhler, 1989).

The cytochrome P450 (*CYPs*), especially families 1–3, are the most critical phase I metabolizing enzyme capable of catalyzing oxidative biotransformation of several xenobiotics, including PAHs (Goldstone and Stegeman, 2006; Shimada, 2006). The diversity of isoforms conferred wide biological roles for adaptation and survival of organisms in most diverse environments (Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000). In the present study, four cytochrome P450 isoforms: *CYP1A1-like*, *CYP356A1*, *CYP2-like* and *CYP2AU2-like* were evaluated.

In vertebrates, cytochrome P450 family 1 is involved into PAH biotransformation and PAH can induce the *CYP1* gene expression and enzyme activity of ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD), mediated by the cytoplasmic aryl hydrocarbon receptor (AhR) (Hahn, 2002; Maranhão et al., 2012; Pereira et al., 2014; Siebert et al., 2017; Moreira et al., 2019). In invertebrates, studies reported that *CYP1-like* gene transcripts could be species-specific in bivalves against PAHs exposure (Piazza et al, 2016, Reis et al., 2020, Zanette et al, 2013).

Oysters from SER showed an upregulation of *CYP1A1-like* (4.5-fold) transcript levels in relation to SAL (Fig. 3A), suggesting that the AhR pathway in *C. gigas* was activated by exposure to these contaminants. Chi et al. (2019) reported that *CYP1A1-like* was transcriptionally induced in response to short-time exposure to the Algicide Thiazolidinedione 49. In addition, studies reported a relationship between *CYP1A* gene expression in bivalves *C. gasar* (Lüchmann et al., 2015), *Chlamys farreri* (Guo, 2017, Zhou et al, 2020), *C. gigas* and *Mytilus coruscus* (Li et al, 2021) against fuel water accommodated fraction (WAF) and different PAHs such as phenanthrene (PHE), chrysene (CHR) and benzo [a]pyrene (BaP) exposures in laboratory conditions. Similar results in field surveys in Deepwater Horizon Oil Spill areas reported an increased *CYP1A* (*CYP1A-like1* and *CYP1A-like2*) transcript level in *C. virginica* oysters during one year monitoring (Jenny et al., 2016). These findings support the hypothesis that *CYP1A1-like* is transcriptionally induced by organic contaminants present in SER, including the PAH levels bioaccumulated in *C. gigas*.

Figure 3. Transcript levels of biotransformation (*CYP1A-like1*, *CYP356A1-like*, *CYP2A2-like*, *CYP2-like*, *SULT-like*, *GSTA1A-like*, *GSTO.4A-like*) and antioxidant defense (*SOD-like*, *CAT-like*) genes in gills of oysters *C. gigas* from six farming areas in Bays of Santa Catarina Island (BSCI). Statistical differences between each farming area are indicated by lowercase letters ($p < 0.05$).



In a previous study from our research group, a close phylogenetic relationship between *CYP1* family and *CYP356A1* of *C. gigas* was reported (Toledo-Silva et al., 2008) and validated (1.9-fold increase) in oysters exposed in the laboratory to untreated sanitary sewage (Medeiros et al., 2008a, b), suggesting a possible role of this isoform in xenobiotics biotransformation. Interestingly, our results showed enhanced transcript levels of *CYP356A1* in oysters from IMA (Fig. 3B) compared to SAL, SAM, TAP (2-fold, respectively), CAI (2.3-fold) and SER (1.7-fold) in response to higher PAHs levels observed in this area. These results corroborate with previous data obtained by Flores-Nunes et al. (2015) where upregulation of *CYP356A1* transcript levels was observed in gills of *C. gigas* exposed to sanitary sewage for 12 h (5.7-fold) and 24 h (2-fold). Previous studies reported that *CYP356A1* were higher in oysters after exposed to different contaminants, such as neurotoxin brevetoxin (Mello et al., 2012), ibuprofen (Serrano et al., 2015), phenanthrene (PHE) (Lüchmann et al., 2014), pyrene (PYR) (Zacchi et al., 2019), ammonia nitrogen (Cong et al., 2021) and triphenyltin (Ip et al., 2021) in *C. gigas*,

C. gasar, *P. viridis* and *R. philippinarum*. Therefore, these results indicate that *CYP356A1* can be proposed as a molecular biomarker of sewage and PAH pollution.

In vertebrates, the *CYP2* is one of the most diverse and larger CYP family (Guengerich, 2008) showing wide variety of substrates including both drugs (Kubota et al, 2013a, Kubota, 2014b, Mai et al, 2019) and endogenous metabolites (Puthumana et al, 2018; Shi et al., 2018). The knowledge about the role of *CYP2* subfamilies in biotransformation is poorly elucidated in bivalves. However, studies revealed that *CYP2* is the most abundant family and was upregulated in oysters *C. virginica* (López-Landavery et al., 2019) and *C. gigas* (Tian et al., 2021) in response to oil and cadmium exposure, indicating its critical role in biotransformation and detoxification. In the present study, higher *CYP2-like* transcript levels (Fig. 3D) were observed in oysters from SER (3.1-fold), TAP and IMA (3-fold, respectively), the three farming areas with elevated levels of PAHs, when compared to SAM. These results possibly indicate an induction of biotransformation systems to facilitate detoxification and excretion corroborating previous studies. Lüchmann et al. (2014) showed a similar pattern (upregulation) of *CYP2-like1* and *CYP2-like2* transcript levels in oysters *C. gasar* exposed to two concentrations of PHE (100 and 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$). Similarly, *C. gasar* showed enhanced *CYP2-like1* gene expression after PHE exposure in different salinities (Zacchi et al., 2017) and temperature (Lima et al., 2018). Zacchi et al. (2019) also reported that *CYP2-like1* transcription was higher in *C. gasar* after short-time (24 h) exposure to PYR. In scallops *Nodipecten nodosus*, increased transcription levels of *CYP2* family range from 2.95 to 5.6-fold for *CYP2D20-like* (24 h and 96 h, respectively) and 2–2.4-fold for *CYP2UI-like* (24 h and 96 h, respectively) subfamilies after 24 h and 96 h of PHE exposure (Piazza et al., 2016).

According to Reis et al. (2015), *CYP2AU1* is a good molecular biomarker of exposure to PHE for gills, mantle and digestive gland of *C. gasar*. The present results showed that this orthologue gene detected in gills of *C. gigas*, *CYP2AU2-like*, was upregulated in animals collected from IMA (Fig. 3C) in comparison to SER (2.5-fold), CAI and TAP (3.2-fold, respectively). Corroborating our results, Pessatti et al. (2016) observed a higher transcript level of *CYP2AU1* in *C. gasar* in situ exposed to a contaminated site in Florianópolis North Bay (Bücheller River mouth) in relation to two sites in north bay of BSCI (Biguaçu: 17-fold; Ratonés: 18-fold). Enhanced transcript levels of *CYP2AU2-like* (1.5-fold) were also observed in *C. gigas* exposed to higher concentration of fluorene (1.2 μM) for 24 h (Reis et al., 2020). Previous studies with *C. gasar* and *C. gigas* have shown that *CYP2AU1-like* transcription was induced by diesel fuel, PHE, PYR, FLU and ibuprofen exposures (Lüchmann et al, 2014,

Serrano et al, 2015, Zacchi et al., 2017, Zacchi et al., 2019), reinforcing the hypothesis about the role of its subfamily in xenobiotic biotransformation, especially PAHs.

Concerning phase II of biotransformation, several enzymes perform conjugations reactions aiming the inactivation or detoxification of xenobiotics, through the increase on water solubility and excretion (Jancova et al., 2010). The Glutathione *S*-Transferase superfamily is of the most important enzymes in drug and endogenous conjugation due to its high affinity for electrophilic compounds and metabolites resulting from phase I of biotransformation (Hayes et al., 2005). The GSTs superfamily had several isoforms distributed in different classes, biological fractions (cytosolic, mitochondrial and microsomal), so that conferred diversity in their biological roles, such as xenobiotics biotransformation, antioxidant defense and endogenous metabolism (Chaurasia et al, 2016). In mammals, there were seven cytosolic classes of GST (alpha, mi, pi, sigma, theta, omega, zeta), beyond mitochondrial (Kappa) and microsomal (MAPEG) isoforms (Hayes et al., 2005). Compared to vertebrates, the role of GST classes in bivalves has not been fully elucidated, though studies suggest involvement of GST omega class in antioxidant defense systems (Board, 2000, Board, 2011). In the present study, oysters from IMA showed an increase in *GSTO.4A-like* (Fig. 3G) transcript levels in comparison to animals from CAI (4.2-fold) and SAL (1.5-fold). These findings suggest that oysters from IMA showed a higher capacity to protect against oxidant damage possibly associated to PAH contamination compared to other monitored aquaculture sites. Corroborating this hypothesis, a similar increase in *GSTO* transcript levels was also observed in *C. gigas* exposed to 1.2 μM of FLU (1.2-fold) for 24 h (Reis et al., 2020) and *C. gasar* exposed for 24 h to PYR (0.5 μM , 1.6-fold) and 96 h (0.25 μM , 1.6-fold) (Zacchi et al., 2019). The same was observed in the digestive gland of clams *Ruditapes philippinarum* resulting from Benzo [a]pyrene (BaP) and Benzo [b]Fluoranthene (BbF) exposure at day 6 (Zhou et al., 2022). Oysters *C. gasar* showed higher *GSTO* transcript levels (9-fold) after exposure to PHE at concentration of 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Lüchmann et al., 2014).

Several studies have reported that the *GST* expression in bivalves is tissue-specific (Hu et al, 2012, Li et al, 2018, Rhee et al, 2008, Wan et al., 2008, Wang, 2013, Wang et al, 2018, Yao et al, 2017). These findings are associated with physiological roles and vulnerability of sentinel animals against environmental pollutants. In the present study, *GSTA1A-like* transcript levels did not show significant differences (Fig. 3G). In accordance to our results, transcript levels of *GSTA-like* in *C. gasar* did not differ in monitoring of BSCI areas (Pessatti et al., 2016). Zhou et al. (2022) observed that *GSTA* is transcriptionally higher (basal levels) in gills of *R. philippinarum*, compared to digestive gland, adductor muscle, mantle and blood cells.

Differently, a higher *GSTA* induction was observed after BaP and BbF exposure (at day 6) in the digestive gland of *R. philippinarum* (Zhou et al., 2022).

The sulfotransferase (*SULT*) superfamily also plays a fundamental role in biotransformation of an endogenous compounds (e. g. steroids, catecholamines, serotonin, eicosanoids) as well xenobiotics such as drugs and environmental pollutants (Gamage, 2006, Glatt and Meinl, 2004, Jancova et al, 2010). The SULTs catalyze the conjugation reaction of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) with an O-, N- or S- acceptor group of an appropriate molecule (Jancova et al., 2010). This mechanism confers an increase of water solubility and facilitates excretion, being associated with inactivation or detoxification (Glatt and Meinl, 2004). In this present study, no significant differences were observed in the transcript levels of *SULT-like* (Fig. 3E) in the oysters from the monitored sites, indicating that this system was not induced in the organisms from these areas.

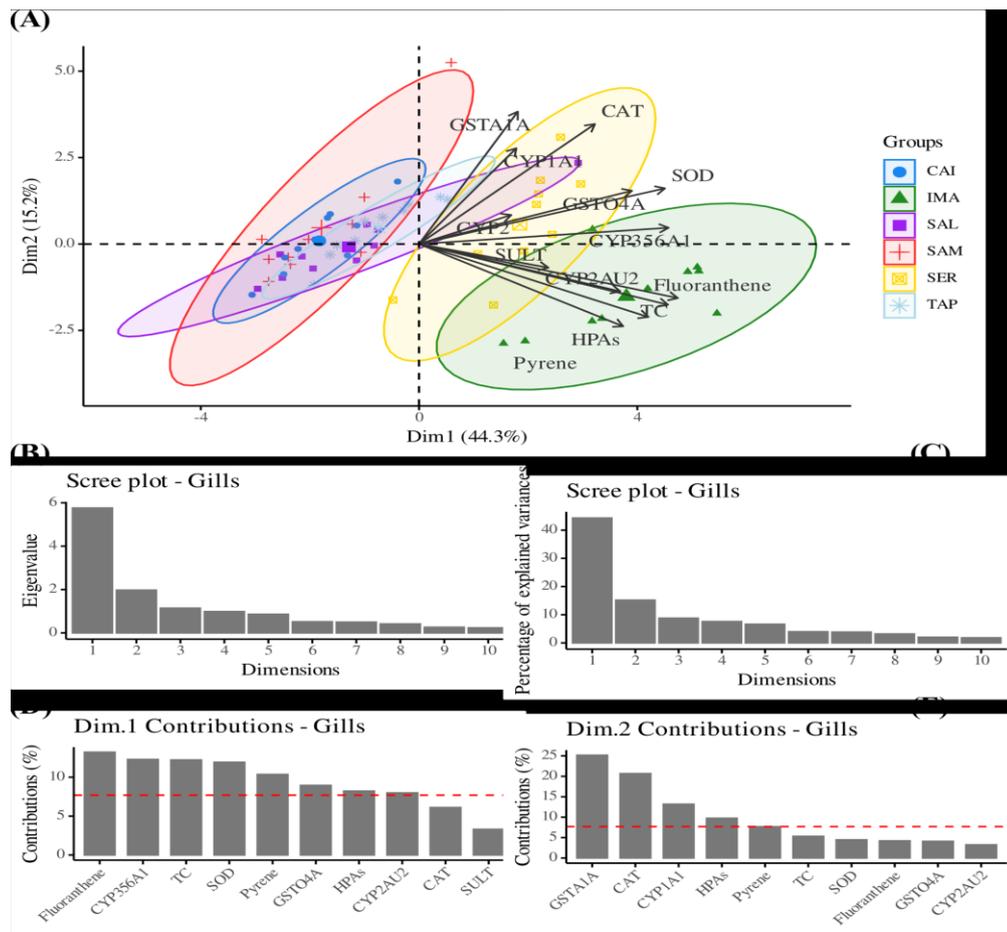
The exposure to chemical contaminants and their biotransformation has been extensively associated in aquatic animals to an oxidative stress condition that can lead to injuries to biomolecules such as DNA damage, lipid peroxidation and protein oxidation (Almeida et al., 2014; Halliwell, 2011; Capó et al., 2015; Sies; Berndt; Jones, 2017; Fernández-Cisnal et al., 2018; Vieira et al., 2018; Sifi and Soltani, 2018; Piazza et al., 2019; Yang et al., 2020; Falfunshynska et al., 2021). The major antioxidant enzymes are *SOD* and *CAT*. *SOD* is the first line of antioxidant defense through the dismutation of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) and conversion to hydrogen peroxide (H_2O_2), preventing or minimizing cascade formation of ROS (Miller, 2012). Following *SOD* activity, the catalase (*CAT*) acts in the degradation of H_2O_2 into molecular oxygen and water (Birben et al., 2012). Our results showed higher transcript levels of *SOD-like* (Fig. 3H) in oysters from IMA compared to SAL, SAM, CAI (2-fold, respectively) and TAP (1.5-fold). Studies reported the role of *CYP450* contributing to an oxidative stress (Robertson et al., 2001; Zangar et al., 2004; Almeida et al., 2007; Stading et al., 2020). These findings could indicate that a prooxidant conditions resulting from contaminants present in oysters from IMA induced a response in enzymatic antioxidant defense in order to minimize oxidative damages resulting from biotransformation. On the other hand, an upregulation of *CAT-like* was observed in oysters from SER compared to CAI (2.5-fold) and SAL (2.3-fold) (Fig. 3I). In the line with these results, increased transcript levels of *SOD* and *CAT* were also observed in *Perna viridis* exposed to *Prorocentrum lima* (Diarrhetic shellfish poisoning-toxin producer) during short (3–6 h) and long-time (96 h) (He et al., 2019). Mussels *Mytilus coruscus* exposed to benzo(a)pyrene (5 and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) for 48 h showed an induction of *SOD*, both mRNA and enzymatic activity (Qi and Tang, 2020). Similar results were reported

in clams *Meretrix meretrix* exposed to H₂O₂ 12 h and 24 h followed by *Vibrio parahaemolyticus* challenge where significantly higher CAT expression was observed (Wang et al., 2013). In this context, the increase in *CYP450* transcript levels observed of *C. gigas* in the present study reinforce our hypothesis that IMA and SER are the most impacted areas by environmental contaminants.

2.4.4 Relationship between PAH levels and molecular responses observed in *C. gigas*

The principal component analysis was performed to evaluate the relationship between molecular responses and the detected PAH levels (total and isolated) (Fig. 4A). Dim1 and Dim2 represent 44.3% and 15.2%, respectively, totalling 59.5% of the responses observed in the present study (Fig. 4C). IMA and SER showed higher levels of PAH contamination. The scree plot of contributions per variable in Dim1 (Fig. 4D) demonstrated a positive association between the transcript levels of *CYP356A1*, *SOD-like*, *GSTO.4A-like*, *CYP2AU2-like* and PAH concentrations (total, fluoranthene and pyrene). Especially, a strong association with PYR levels was observed in *CYP2AU2-like* isoforms. The specific induction of target-genes suggests an involvement in fluoranthene and pyrene biotransformation. In addition, these results highlight IMA and SER as the oyster farming areas most impacted by the sewage discharges (Garbossa et al., 2017), which is the main source of PAH contamination in the surrounding area.

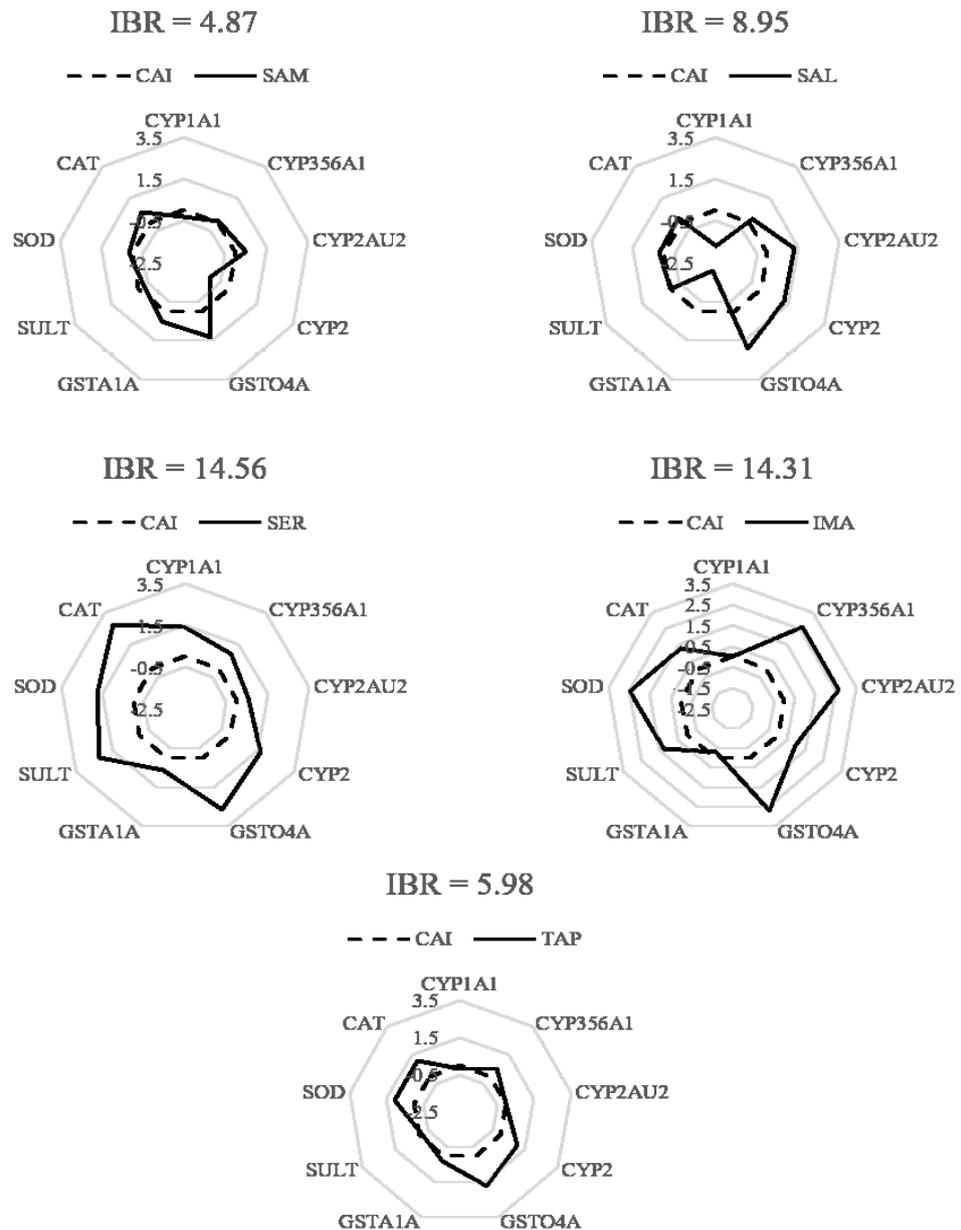
Figure 4. (A) Principal component analysis (PCA) for the molecular biomarkers (*CYP1A1*-like, *CYP2-like*, *CYP2AU2*-like, *CYP256A1*, *GSTA1A*-like, *GSTO4A*-like, *SULT*-like, *SOD*-like, *CAT*-like), PAH concentrations (total, fluoranthene and pyrene) and thermotolerant coliforms (TC) in the gills of *C. gigas* oysters collected from six aquaculture areas from north and south bays of Santa Catarina Island (Florianópolis, SC – Brazil). The observations are represented by colored symbols described in legend, whereas the variables are represented by their correlations. (B) Scree plot with extracted eigenvalues per dimension. (C) Scree plot percentage of explained variances per dimension. (D) and (E) Contributions proportional to variables in dimension 1 and 2, respectively.



The Dim2 showed an association between transcript levels of *GSTA1A-like*, *CAT-like* and *CYP1A1-like* in oysters from SER. These results are corroborated by studies that report the presence of other environmental contaminants such as LABs, organochlorine pesticides, PCB (Souza et al., 2012) and metals (Souza et al., 2016) that may be related to the induction of molecular results observed, especially antioxidant systems, in oysters from SER. In this monitoring, higher levels of LABs were detected in soft tissues of *C. gigas* from SER (unpublished data) compared to other farming areas, which may corroborate with our results. An association in *SOD-like* and *GSTO.4A-like* transcript levels demonstrated an induction of antioxidant systems to prevent or minimize oxidative damages resulting from contaminant exposure. On the other hand, oysters from SAL, SAM, CAI and TAP showed a distinct pattern of biotransformation genes (phase I and II) and antioxidant systems compared to other areas. Based on PAH levels, we suggest that these farming areas are less impacted by PAH.

The multibiomarker approach is commonly used in biomonitoring programs aiming to assess the responses at different levels of biological organization. Though, the global interpretation of the results is necessary to assess environmental risk, in addition to support decision makers for compensatory and mitigation acts. In this context, the Integrated Biomarker Response (IBR) can be a useful tool for interpretation of biological effects in sentinel organisms in response to environmental stress conditions in field surveys. The principle of IBR index version 2 (IBRv2) (Sanchez et al., 2013), is based on reference deviation between disturbed and undisturbed state. Corroborating with the PCA, a higher IBRv2 values of SER (IBRv2 = 14.56) and IMA (IBRv2 = 14.31), compared to the CAI (reference) was observed (Fig. 5). The IBRv2 from oysters from SAL was slightly higher (IBRv2 = 8.95) than that from TAP (IBRv2 = 5.98) and approximately 2-fold higher when compared to SAM (IBRv2 = 4.87). Overall, obtained results highlighted that oyster *C. gigas* from IMA and SER farming areas were more susceptible to the contaminant exposure and suggest an induction of biotransformation (phase I and II) and antioxidant systems as defense mechanisms in response to local contamination, including PAHs.

Figure 5. Default radar plot containing the selected biomarkers in gills of *C. gigas* for each monitoring sites in North Bay (SAM: Sambaqui, SAL: Santo Antônio de Lisboa, SER: Serraria) and South Bay (TAP: Tapera, IMA: Imaruí). Caieira (CAI), highlighted in the center by blue line, selected as a reference group.



2.5 Conclusion

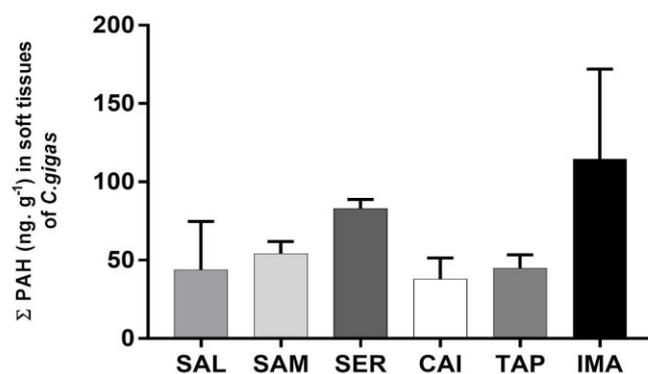
Obtained results showed that aquaculture areas from North and South Bays of Florianópolis (SER and IMA, respectively) were contaminated by human-derived contaminants, which could affect the oyster farming activity. Upregulated transcript levels of phase I (*CYP1A*-like, *CYP356A1*-like, *CYP2*-like and *CYP2AU2*-like) and II (*GSTO.4A*-like) suggest an activation of biotransformation genes, possibly aiming to minimize the PAHs toxicity. The PCA suggests a positive and significant relationship between *CYP2AU2*-like and *SULT*-like transcript levels in

oysters from IMA and PAH (total and pyrene) concentrations. Adaptive response against a prooxidant condition can be associated with an upregulation in *SOD-like* and *CAT-like* transcripts in oysters kept at SER and IMA. The higher IBR values observed in oysters from these farming areas indicate more stressful conditions in these animals. Overall, the transcriptional responses observed in this study show the risks resulting from the exposure to sanitary sewage and its components. These results raise the need to improve sewage treatment in these areas, as well as in other aquaculture farming zones in the world.

2.6 Supplementary material

Figures

Supplementary Figure 1. Total polycyclic aromatic hydrocarbons (mean \pm standard deviation) concentration in soft tissues of *C. gigas* oysters collected six sites in the bays of Santa Catarina Island (BSCI). The results are expressed in ng g^{-1} dry weight ($n=3$ pools of 4 oysters from each site).



TABLES

Table S-1. Selected genes, primer sequences and GenBank access

Symbol	Gene name	Primer sequence 5' - 3'	GenBank access
Genes of interest			
<i>CYP1A</i>	<i>Cytochrome 450 1A1-like</i>	F - GCC CAC GGT TGT AAT ATG CGG TAA AG R - GGC TCT TCA TGT CGT TCA GAC TCT TGA T	XM_011442190.1 XM_011458840.1 XM_011458841.1
<i>CYP356A1</i>	<i>Cytochrome 450 356A1-like</i>	F - TGA AAC CTT CCA GCC AGG AGT CAA CA R - GGT CTG AAC GAC GTG CGT ATC CA	EF645271.1
<i>CYP2AU2</i>	<i>Cytochrome 450 2 AU 2</i>	F- GCC ACT TCT AGT CCA TCT TCA CCT GC R - GCGT CTT CGA TTT ACT TCA TTT GCG AAC CC	XM_011436993.2
<i>CYP2</i>	<i>Cytochrome 450 2B15-like 2</i>	F- ATC CTC GGT GTC GGC GAT GAG TTT R - CGG TCC AGG AAT GTC TGT TGA TGG TGT	XM_011431418.1
<i>SULT</i>	<i>Sulfotransferase-like</i>	F - GCT ATG AAA TTG TGG ACA TGC TGA GAA AC R - TAG AAC ACC ATC GGG CAC CT	XM_011438750.1
<i>GSTO</i>	<i>Glutathione-S-transferase Omega 4A-like</i>	F - CCG AAC CTG ACT GCT TAC ATG GAT R - TCT CGG CAA TCA CTA CAG TCC AAC G	XM_011448982.1
<i>GSTA</i>	<i>Glutathione-S-transferase Alpha A1-like</i>	F - GCC CAT CTG ACC TAC TTT AAT GGA AGA R - AA CGG TTG CCG CTC TGT TAA G	XM_034478429.1
<i>SOD</i>	<i>Superoxide Dismutase</i>	F - GGC CCT CAA TCC ATC ATT GGA AGA R - TGA TAC CGA TCA CTC CAC AAG CCA	AJ496219.1
<i>CAT</i>	<i>Catalase</i>	F - AGC TAA TCG TTT GTC TGC CGA GGA R - ACA CTT TGG TCA CAT CGA ACG GGT	EF687775.2

Table S-2. Polycyclic aromatic hydrocarbon concentration in whole soft tissues of *Crassostrea gigas* oysters collected at six sites at north and south Bays of Santa Catarina Island (BSCI). The results are expressed in ng g⁻¹ dry weight. < BDL = Below detection limit (2.5 ng g⁻¹). Bold represent sites and PAHs were observed with statistical difference ($p < 0.05$) (n=3 pools of 4 oysters from each site).

Compound	NORTH BAY			SOUTH BAY		
	SAL	SAM	SER	CAI	TAP	IMA
Naphthalene	15.5 ± 3.5	13.9 ± 7.2	10.5 ± 0.7	11.7 ± 6	2.8 ± 2.8	18.5 ± 15.5
C1-Naphthalene	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL
C2-Naphthalene	3 ± 0.3	1.1 ± 2	1.2 ± 2.1	1.4 ± 2.4	4.3 ± 4.1	7.5 ± 9.5
Acenaphthylene	<BDL	<BDL	<BDL	0.9 ± 1.6	<BDL	2.3 ± 4.1
Acenaphthene	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL
C3-naphthalene	3.4 ± 1.2	2.4 ± 2	5.4 ± 0.5	2.6 ± 2.3	5.5 ± 3.5	4.8 ± 8.3
Fluorene	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL
C1-Fluorene	2 ± 1.7	0.9 ± 1.6	5.6 ± 0.5	1.5 ± 2.6	0.9 ± 1.6	2.6 ± 4.5
Dibenzothiophene	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL
Phenanthrene	4.2 ± 0.9	1.8 ± 3	6.2 ± 1	4.2 ± 0.5	2.7 ± 2.3	10 ± 4.9
Anthracene	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL
C2-Fluorene	3.3 ± 0.3	2.7 ± 4.7	6.3 ± 0.9	1.1 ± 1.9	<BDL	7.2 ± 10.3
C1-dibenzothiophene	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	1.5 ± 2.6
C1-Phenanthrene	<BDL	1.1 ± 1.9	1.2 ± 2.1	1 ± 1.7	<BDL	3.6 ± 3.4
C2-dibenzothiophene	<BDL	4.2 ± 7.3	0.9 ± 1.6	<BDL	<BDL	5.2 ± 6.7
C2-Phenanthrene	7.7 ± 1.5	4.7 ± 5.3	11.2 ± 1.9	6.7 ± 0.7	4.6 ± 1.3	9.9 ± 7.8
Fluoranthene	5.5 ± 0.6	5.3 ± 1.4	9.3 ±	4.4 ± 0.3b	6.4 ± 1.2	10.8 ± 4.9a
Pyrene	5.6 ± 0.1	3.7 ± 1b	7.5 ± 0.8	6.5 ± 1	4.8 ± 0.9	9.6 ± 4.5a
C1-Pyrene	3.9 ± 0.8	2.1 ± 1.9b	6.4 ± 1.8a	2.7 ± 0.2b	4.5 ± 1	6.7 ± 1.4a
C2-Pyrene	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	2 ± 3.4
Benz[a]anthracene	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL
Chrysene	<BDL	<BDL	2.9 ± 0.5	<BDL	<BDL	3 ± 2.6
C1-Chrysene	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL
C2-Chrysene	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL
Benzo[b]fluoranthene	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	1.2 ± 2.1	2.5 ± 2.1
Benzo[k]fluoranthene	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	2.2 ± 2
Benzo[e]pyrene	<BDL	<BDL	1 ± 1.7	<BDL	<BDL	2.1 ± 1.8
Benzo[a]pyrene	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL
Perylene	<BDL	<BDL	7.3 ± 1.1a	<BDL	<BDL	2.2 ± 2b
Indene[123cd] pyrene	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL
Dibenz[ah]anthracene	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL
Benzo[ghi]perylene	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL	<BDL
Σ PAH	54 ± 9.2	43.8 ± 35.7	83 ± 6.8	44.7 ± 10	37.8 ± 15.7	114.2 ± 66.4

2.7 References

- Abdel-Shafy and Mansour, 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. **Egyptian Journal of Petroleum**, 25 (2016), pp. 107-123.
- Almeida et al., 2007. 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 B - Molecular and Integrative Physiology**, v. 146, pp. 588-600.
- Almeida et al., 2014. Presence of the pharmaceutical drug carbamazepine in coastal systems: effects on bivalves. **Aquatic Toxicology**, v. 156, pp. 74-87.
- Backes, 2016. População de Florianópolis quase triplicou no Revéillon, aponta CASAN. Rede Catarinense de Notícias (RNC). Available in: Access: 08/01/2022 <https://rcnonline.com.br/popula%C3%A7%C3%A3o-de-florian%C3%B3polis-quase-triplicou-no-r%C3%A9veillon-aponta-casan-1.1955463> (2016)
- J.M. Barragán, M. Andrés. 2015. Analysis and trends of the world's coastal cities and agglomerations. **Ocean & Coastal Management.**, v. 114, pp. 11-20.
- Baumard, 1988. Origin and bioavailability of PAHs in the mediterranean sea from mussel and sediment records. **Estuarine Coastal Shelf Science**, v. 47, pp. 77-90.
- Beliaeff and Burgeot, 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment
Environmental Toxicology and Chemistry, 21 (6) (2002), pp. 1316-1322
- Birben et al., 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, 5 (1) (2012), pp. 9-19
- Board, 2000. Identification, characterization, and crystal structure of the omega class glutathione transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275 (2000), pp. 24798-24806.
- Board, 2011 The omega-class glutathione transferases: structure, function, and genetics. **Drug Metabolism Reviews**, v. 43 (2011), pp. 226-235.
- Cabral, 2020. Water masses seasonality and meteorological patterns drive the biogeochemical processes of a subtropical and urbanized watershed-bay-shelf continuum. **Science Of The Total Environment**, v. 749, p. 141553.
- Campos et al, 2013a. Environmental influences on fecal indicator organisms in coastal waters and their accumulation in bivalve shellfish. **Estuarine and Coasts**, v. 36, pp. 834-853
- Campos, 2013b. Trends in the levels of *Escherichia coli* in commercially harvested bivalve shellfish from England and Wales, 1999–2008. **Marine Pollution Bulletin**, v. 67, pp. 223-227.

- Capó et al, 2015. Oxidative status assessment of the endemic bivalve *Pinna nobilis* affected by the oil spill from the sinking of the Don Pedro. **Marine Environmental Research**, v. 110 (2015), pp. 19-24
- Cerqueira et al, 2019. Effects of urbanization on water quality in a watershed in northeastern Brazil
Environmental and Monitoring Assessment., v. 192, pp. 65-82.
- Chaurasia et al, 2016. In-silico analysis and mRNA modulation of detoxification enzymes GST delta and kappa against various biotic and abiotic oxidative stressors. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 54, pp. 353-363
- Chi et al, 2019. Detoxification, apoptosis and immune transcriptomic responses of the gill tissue by bay scallops following exposure to the algicide thiazolidinedione 49. **Biomolecules**, 9 (2019), p. 310
- Commission Regulation 1881/2006, 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of European Union**, L364 (2006), pp. 5-24
- CONAMA nº 357, 2005. Environment National Council - Resolution N° 357/2005. Provides the Classification of Bodies of Water and Environmental Guidelines for Their Classification, as Well as Establishing the Conditions and Standards for the Discharge Effluents, and Other Measures
- CONAMA nº 430, 2011. Environment National Council - Resolution N° 430/2011. Provides the Conditions and Standards for the Discharge of Effluents, Complements and Amends Resolution N° 357/2005 of the National Council for the Environment-CONAMA (2011)
- Cong et al, 2021. Digital gene expression analysis in the gills of *Ruditapes philippinarum* exposed to short- and long-term exposures of ammonia nitrogen. **Aquatic Toxicology**, v. 94, pp. 121-131.
- do Turismo, 2019. Ministério do Turismo. Destinos nacionais em alta em 2019 Available in: <http://antigo.turismo.gov.br/%C3%BAltimas-not%C3%ADcias/12275-destinos-nacionais-em-alta-em-2019.html>. Access: 08/01/2022 (2019)
- Elmqvist et al., 2021. Urbanization in and for the Anthropocene. **npj Urban Sustainability**, v. 1 (2021).
- EPAGRI, 2017. EPAGRI, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri)
Dados estatísticos da aquicultura - Infoagro/SC - Moluscos. Síntese informativa da maricultura., EPAGRI (2017). Available:
<https://cedap.epagri.sc.gov.br/index.php/estudos/#estatisticas>, Accessed 1st Aug 2022
- Falfunshynska et al, 2021. Biomarker-based assessment of sublethal toxicity of organic UV filters (ensulizole and octocrylene) in a sentinel marine bivalve *Mytilus edulis*. **Science of the Total Environment**, v. 798 (2021), Article 149171.
- Farkas et al, 2020. Viral Indicators for Tracking Domestic Wastewater Contamination in the Aquatic Environment, **Water Research**, vol. 181, 115926.

- Fernández-Cisnal, 2018. Metabolomic alterations and oxidative stress are associated with environmental pollution in *Procambarus clarkii*. **Aquatic Toxicology**, v. 205, pp. 76-88
- Ferreira et al. 2020. Short-term spatiotemporal biomarker changes in oysters transplanted to an anthropized estuary in Southern Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 709, p. 136042
- Ferreira et al. 2021. Integrated biomarker responses in oysters *Crassostrea gasar* as an approach for assessing aquatic pollution of a Brazilian estuary. **Marine Environmental Research**, v. 165, p. 105252
- Fiorito et al, 2019. A relationship between environmental pollutants and enteric viruses in mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **Environmental Research**, v.169, pp. 156-162
- Fiorito et al, 2021. Oyster *Crassostrea gigas*, a good model for correlating viral and chemical contamination in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 172, Article 112825
- Flores-Nunes et al, 2015. Effect of linear alkylbenzene mixtures and sanitary sewage in biochemical and molecular responses in pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, pp. 17386-17396.
- Fonseca et al., 2021. Local and meso-scale pressures in the eutrophication process of a coastal subtropical system: challenges for effective management. **Estuarine and Coastal Shelf Science**, 250 (2021), pp. 107-109
- Gamage et al. 2006. Human Sulfotransferases and Their Role in Chemical Metabolism **Toxicological Sciences**, v. 90 (1), pp. 5-22.
- Gao et al, 2018. Embryonic exposure to benzo(a)pyrene inhibits reproductive capability in adult female zebrafish and correlation with DNA methylation. **Environmental Pollution**, v. 240, pp. 403-411
- Garbossa et al, 2017. Thermotolerant coliform loadings to coastal areas of Santa Catarina (Brazil) evidence the effect of growing urbanization and insufficient provision of sewerage infrastructure. **Environmental and Monitoring Assessment**, v. 189, p. 27.
- Glatt and Meinel, 2004. Pharmacogenetics of soluble sulfotransferases (SULTs) **Naunyn-Schmiedeberg Archives of Pharmacology**, v. 369, pp. 55-68
- Goldstone and Stegeman, 2006. A revised evolutionary history of the CYP1A subfamily: gene duplication, gene conversion and positive selection. **Journal of Molecular Evolution**, v. 62, pp. 708-717
- Guengerich, 2001. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. **Chemical Research in Toxicology**, 14, pp. 611-650.
- Guengerich, 2008. Cytochrome P450 and chemical toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, pp. 70-83

- Guo, 2017. The detoxification responses, damage effects and bioaccumulation in the scallop *Chlamys farreri* exposed to single and mixtures of benzo[a]pyrene and chrysene. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 191, pp. 36-51
- Hahn, 2002. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. **Chemico-Biological Interactions**, v. 141, pp. 131-160.
- Halliwell, 2011. Free radicals and antioxidants – *quo vadis?* **Trends in Pharmacology Sciences**, v. 32, pp. 125-130.
- Halliwell and Gutteridge, 2015. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, New York (2015).
- Haritash and Kaushik, 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review *Journal of Hazardous Materials*, v. 169, pp. 1-15.
- Hayes et al, 2005. Glutathione transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, pp. 51-88.
- He et al, 2019. Up-regulation of Nrf2-dependent antioxidant defenses in *Perna viridis* after exposed to *Prorocentrum lima*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 90, pp. 173-179.
- Hrycay and Bandiera, 2015. Involvement of cytochrome P450 in reactive oxygen species formation and cancer. **Advances in Pharmacology**, v. 74, pp. 35-84.
- Hu et al, 2012. Cloning, identification and functional characterization of a pi-class glutathione-S-transferase from freshwater mussel *Cristaria plicata*. **Fish and Shellfish Immunology**, v.32, pp. 51-60
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2021. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) **Estimativas de população para os municípios e as unidades da Federação brasileiras**. Available in: 04/01/2022 https://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_2021/estimativa_dou_2021.pdf Access (2021)
- Ip et al, 2021. Transcriptomics Reveal Triphenyltin-Induced Molecular Toxicity in the Marine Mussel *Perna Viridis*. **Science of the Total Environment**. vol. 790 (2021), Article 148040
- Jancova et al, 2010. Phase II Drug Metabolizing Enzymes. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky**. vol. 154 (2010), pp. 103-116
- Jenny et al, 2016. Transcriptomic evaluation of the American oyster, *Crassostrea virginica*, deployed during the Deepwater Horizon oil spill: evidence of an active hydrocarbon response pathway. **Marine Environmental Research**, v.120, pp. 166-181
- Kubota et al, 2013a. The cytochrome P450 2AA gene cluster in zebrafish (*Danio rerio*): expression of *CYP2A1* and *CYP2A2* and response to phenobarbital-type inducers. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 272, pp. 172-179

- Kubota, 2014b. Role of pregnane X receptor and aryl hydrocarbon receptor in transcriptional regulation of *PXR*, *CYP2*, and *CYP3* genes in developing zebrafish. **Toxicological Sciences**, 143 (2014), pp. 398-407
- Lesser, 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. **Annual Review of Physiology**, v. 68, pp. 253-278
- Lewis and Maslin, 2015. Defining the Anthropocene. **Nature**, 519 (2015), pp. 171-180
- Li et al, 2018. Identification and characterization of two distinct sigma-class glutathione-S-transferase from freshwater bivalve *Cristaria plicata*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B - Biochemistry and Molecular Biology**, v. 219–220, pp. 52-61
- Li et al, 2021. Effects of oxidation defense system exposure to Benzo(a)pyrene on CYP450 gene expression and EROD activity in *Crassostrea gigas* and *Mytilus coruscus*. **Environmental Pollutants and Bioavailability**, v. 33, pp. 206-213
- Lima et al., 2018. Molecular and cellular effects of temperature in oysters *Crassostrea brasiliiana* exposed to phenanthrene. **Chemosphere**, 209, pp. 307-318
- López-Landavery, 2019. Transcriptomic response and hydrocarbon accumulation in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) exposed to crude oil. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 225, p. 108571
- Lüchmann et al, 2014. A light in the darkness: new biotransformation genes, antioxidant parameters and tissue-specific responses in oysters exposed to phenanthrene. **Aquatic Toxicology**, v. 152, pp. 324-334
- Lüchmann et al, 2015. Key metabolic pathways involved in xenobiotic biotransformation and stress responses revealed by transcriptomics of the mangrove oyster *Crassostrea brasiliiana*. **Aquatic Toxicology**, v. 166, pp. 10-20
- Lyu et al., 2018. Impacts of urbanization on ecosystem services and their temporal relations: A case study in Northern Ningxia, China. **Land use policy**, v. 77, pp. 163-173
- MacLeod, 1986. **Extractable Toxic Organic Components Standard Analytical Procedures of the NOAA National Analytical Facility (2nd)**, Department of Commerce, NOAA/NMFS. NOAA (1986), p. 121
- Mai et al, 2019. Histological, biochemical and transcriptomic analyses reveal liver damage in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to phenanthrene. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 225, Article 108582
- Maranho et al, 2012. The application of biochemical responses to assess environmental quality of tropical estuaries: field surveys. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 14, p. 2608
- Martins et al, 2020. Concentration and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in oysters from Todos os Santos Bay (Bahia, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 151, Article 110781

- Medeiros et al, 2008a. Differential gene expression in oyster exposed to sewage. **Marine Environmental Research**, pp. 156-157.
- Medeiros et al, 2008b. Induced gene expression in oyster *Crassostrea gigas* exposed to sewage. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, pp. 362-365
- Mello, 2012. Cellular and transcriptional responses of *Crassostrea gigas* hemocytes exposed *in vitro* to brevetoxin (PbTx-2). **Marine Drugs**, v. 10, pp. 583-597
- Miller, 2012. Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. **Febs Letters**, 586 (5) (2012), pp. 585-595
- Moreira et al, 2019. Impacts of dredging on biomarkers responses of caged bivalves in a semi-arid region (Ceará State, NE, Brazil). **Marine Environmental Research**, v. 151, Article 104784
- Moresco et al, 2012. Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil
Marine Pollution Bulletin, 64 (2012), pp. 40-48
- Neumann et al, 2015. Future coastal population growth and exposure to sea-level rise and coastal flooding - a global assessment. **PLoS One**, 10 (3) (2015)
- Olenycz et al, 2015. Comparison of PCBs and PAHs levels in European coastal waters using mussels from the *Mytilus edulis* complex as biomonitors. **Oceanology**, v. 57, pp. 196-211
- Pereira et al, 2014. Ecological relevance of sentinel's biomarker responses: a multi-level approach. **Marine Environmental Research**, v. 96, pp. 118-126.
- Pessatti et al., 2016. Upregulation of biotransformation genes in gills of oyster *Crassostrea brasiliana* exposed *in situ* to urban effluents, Florianópolis Bay, Southern Brazil.
Ecotoxicology and Environmental Safety, 131 (2016), pp. 172-180
- Piazza et al, 2016. Exposure to phenanthrene and depuration: changes on gene transcription, enzymatic activity and lipid peroxidation in gills of scallops *Nodipecten nodosus*. **Aquatic Toxicology**, v. 177, pp. 146-155
- Piazza et al, 2019. Transcriptional effects in the estuarine guppy *Poecilia vivipara* exposed to sanitary sewage in laboratory and *in situ*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 182, Article 109411
- Puthumana et al, 2018. Nine co-localized cytochrome P450 genes of the *CYP2N*, *CYP2AD*, and *CYP2P* gene families in the mangrove killifish *Kryptolebias marmoratus* genome: identification and expression in response to B[α]P, BPA, OP, and NP. **Aquatic Toxicology**, v. 187, pp. 132-140
- Qi and Tang, 2020. The Nrf2 molecule trigger antioxidant defense against acute benzo(a)pyrene exposure in the thick shell mussel *Mytilus coruscus*. **Aquatic Toxicology**, v. 226, Article 105554

Reis et al., 2015. Histological responses and localization of the cytochrome P450 (CYP2A1) in *Crassostrea brasiliana* exposed to phenanthrene. **Aquatic Toxicology**, v. 169, pp. 79-89

Reis et al., 2020. Differential responses in the biotransformation systems of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1789) elicited by pyrene and fluorene: molecular, biochemical and histological approach – Part II. **Aquatic Toxicology**, v. 226, Article 105565

Rhee et al, 2008. A Mu-class glutathione *S*-transferase (*GSTM*) from the rock shell *Thais clavigera*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 148, pp. 195-203

Rhinn et al, 2008. One-step quantification of single-stranded DNA in the presence of RNA using Oligreen in a real-time polymerase chain reaction thermocycler. **Analytical Biochemistry**, v.372, pp. 116-118

Rice et al, 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, **Water Environmental Research**, Washington, DC (2012)

Rigotto et al, 2010. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianopolis, South Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, pp. 1979-1987

Robertson et al, 2001. Cytochrome P450 enzymes and oxidative stress. **American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 281, pp. G1135-G1139

Salerno et al, 2018. Urbanization and climate change impacts on surface water quality: enhancing the resilience by reducing impervious surfaces. **Water Research**, v. 144, pp. 491-502

Sanchez et al., 2013. A novel “integrated biomarker response” calculation based on reference deviation concept. **Environmental Science and Pollution Control Research**, v. 20 (2013), pp. 2721-2725

Schlenk and Buhler, 1989. Xenobiotic biotransformation in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Comp. Pharmacol.**, 94 (1989), pp. 469-475

Schmittgen and Livak, 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, 3 (6) (2008), pp. 1101-1108

Serrano et al, 2015. Differential gene transcription, biochemical responses, and cytotoxicity assessment in Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to ibuprofen. **Environmental Science and Pollution Control Research**, v. 22 (2015), pp. 17375-17385

Shi et al, 2018. Cytochrome P450 2A1 molecular clone, expression pattern and different regulation by fish oil and lard oil in diets of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 44, pp. 1019-1026

- Shimada, 2006. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 21 (2006), pp. 257-276
- Siebert et al., 2017. Characterization of ethoxyresorufin O-deethylase activity (EROD) in oyster *Crassostrea brasiliana*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 203, pp. 115-121
- Sies et al., 2017. Oxidative stress. **Annual Reviews in Biochemistry**, 86 (2017), pp. 715-748
- Sifi and Soltani, 2018. Seasonal changes of two biomarkers of oxidative stress (LDH, MDA) in the edible mollusc *Donax trunculus* (Mollusca: Bivalvia) from the Gulf of Annaba (Algeria): correlation with carbohydrate and lipid contents. **Molluscan Research**, 39 (2018), pp. 44-52
- Silveira and Bonetti, 2019. Assessment of the physical vulnerability to erosion and flooding in a sheltered coastal sector: Florianópolis Bay, Brazil. **Journal of Coastal Conservation**, v. 23 (2019), pp. 303-314
- Silvestre, 2020. Signaling pathways of oxidative stress in aquatic organisms exposed to xenobiotics. *Jez-A Ecol. Integrat. Physiol.*, 333 (2020), pp. 436-448
- SNSA, 2016. Ministério do Desenvolvimento Regional. Sistema Nacional de Sanidade Ambiental (SNSA 2016). Disponível em: <http://www.snis.gov.br/diagnostico-agua-e-esgotos>. Acesso em: 08/01/2022.
- SNSA/MCIDADES, 2014. SNSA/MCIDADES. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2012 (2014)
- Souza et al, 2012. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76 (2012), pp. 153-161
- Souza et al, 2016. Metals and pesticides in commercial bivalve mollusc production areas in the North and South Bays, Santa Catarina (Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 15 (2016), pp. 377-384
- Souza et al, 2018. Presence of enteric viruses, bioaccumulation and stability in *Anomalocardia brasiliana* clams (Gmelin, 1791). **International Journal of Food Microbiology**, v. 266 (2018), pp. 363-371
- Stading et al, 2020. Molecular role of cytochrome P450A enzymes in oxidative stress. **Current Opinion of Toxicology**, 20–21 (2020), pp. 77-84
- Sun et al, 2021a. The toxic impacts of microplastics (MPs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on haematic parameters in a marine bivalve species and their potential mechanisms of action. **Science of the Total Environment**, v. 783 (2021), Article 147003

Sun et al, 2021b. A review of human and animals exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: health risk and adverse effects, photo-induced toxicity and regulating effect of microplastics. **Science of the Total Environmental**, v. 773 (2021), Article 145403

Suplicy, 2018. Um plano estratégico para impulsionar a maricultura. *Agropecuária Catarinense*, 32 (2018)
n.2. Available in: <https://publicacoes.epagri.sc.gov.br/RAC/article/view/465>. Access: 08/01/2022

Tian et al, 2021. Genome-wide identification and expression profiling revealed tissue-specific inducible expression of cytochrome P450s conferring cadmium tolerance in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Aquaculture Reports**, v. 19, Article 100582

Toledo-Silva et al., 2008. Cloning a new cytochrome P450 isoform (CYP356A1) from oyster *Crassostrea gigas*. **Marine Environmental Research**, 66 (1) (2008), pp. 15-18

Torres et al, 2012. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and mercury in oysters (*Crassostrea rhizophorae*) from two Brazilian estuarine zones. **International Journal of Oceanograph**, p. 8

US EPA, 1986. **Quality criteria for water (“Gold Book”)**, Office of Water Regulations and Standards, Washington DC (1986), Article EPA-440/5-86-001

Van der Oost et al, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, pp. 57-149

Venkatesan, 1998. Occurrence and possible sources of perylene in marine sediments-a review. **Marine Chemistry**, v. 25 (1998), pp. 1-27

Vieira et al, 2018. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, 198 (2018), pp. 125-134

Vikas and Dwarakish, 2015. Coastal pollution: a review. **Aquatic Procedia**, v. 4, pp. 381-388

Wan et al., 2008. Molecular cloning and characterization of three sigma glutathione S-transferases from disk abalone (*Haliotis discus discus*). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 151, pp. 257-267

Wang et al, 2013. The role of catalase in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam *Meretrix meretrix*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 34 (2013), pp. 91-99

Wang et al, 2018. The mRNA expression profiles demonstrating versatile roles of glutathione S-transferase genes in the mollusk *Chlamys farreri*. **Invertebrate Survival Journal**, v. 15, pp. 302-315

Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000. Cytochromes P450: a success story. **Genome Biology**, v.1 (2000).

- Yang et al, 2020. Mediation of oxidative stress toxicity induced by pyrethroid pesticides in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 234, Article 108758
- Yao et al, 2017. Expression profiles of different glutathione S-transferase isoforms in scallop *Chlamys farreri* exposed to benzo[a]pyrene and chrysene in combination and alone. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, pp. 480-488
- Yu et al, 2016. Spatial–temporal trend and health implications of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in resident oysters, South China Sea: a case study of Eastern Guangdong coast. **Marine Pollution Bulletin**, 110 (2016), pp. 203-211
- Zacchi et al., 2017. Transcriptional changes in oysters *Crassostrea brasiliana* exposed to phenanthrene at different salinities. **Aquatic Toxicology**, v. 183, pp. 94-103.
- Zacchi et al., 2018. Biochemical and molecular responses in oysters *Crassostrea brasiliana* collected from estuarine aquaculture areas in Southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 135, pp. 110-118.
- Zacchi et al., 2019. Differential responses in the biotransformation systems of the oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) elicited by pyrene and fluorene: molecular, biochemical and histological approach - part II. **Aquatic Toxicology**, v. 216, p. 105318
- Zanette et al, 2008. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environmental Research**, v. 66 (2008), pp. 169-198.
- Zanette et al, 2013. Identification and expression of multiple *CYP1-like* and *CYP3-like* genes in the bivalve mollusk *Mytilus edulis*. **Aquatic Toxicology**, 128–129 (2013), pp. 101-112.
- Zangar et al, 2004. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450 **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 199, pp. 316-331.
- Zeng et al., 2018. Distribution, fate and risk assessment of PAHs in water and sediments from an aquaculture - and shipping-impacted subtropical lake, China. **Chemosphere**, v. 201, pp. 612-620
- Zhang et al., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. **Nature**, v. 490 (7418), pp. 49-54.
- Zhou et al, 2020. Study on the AhR signaling pathway and phase II detoxification metabolic enzymes isoforms in scallop *Chlamys farreri* exposed to single and mixtures of PAHs. **Environmental Research**, v. 190, Article 109980
- Zhou et al, 2022. Bioaccumulation and function analysis of glutathione S-transferase isoforms in Manila clam *Ruditapes philippinarum* exposed to different kinds of PAHs. **Journal of Environmental Sciences**, v. 112, pp. 129-139

Wang et al., 2013. cDNA cloning and mRNA expression of four glutathione S-transferase (GST) genes from *Mytilus galloprovincialis*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 34, pp. 697-70

CAPÍTULO III

3. Contaminantes emergentes e legados no litoral sul do Brasil (Santa Catarina): Uma abordagem multibiomarcadores em ostras *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757)

Camila L. V. Bastolla¹; Fernando C. Guerreiro⁵; Miguel Saldaña-Serrano¹; Carlos H. A. M. Gomes³; Daína Lima¹; Camila F. Rutkoski⁵; Jacó J. Mattos²; Vera Helena R. Vidal¹; Bárbara P. H. Righetti¹; Clarissa P. Ferreira⁴; Julia Martim¹; Thiago C. Alves⁵; Claudio M. R. Melo³; Maria R. F. Marques¹; Karim H. Lüchmann⁴; Eduardo A. Almeida⁵; Afonso C. D. Bairy^{1*}

¹ Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

² Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola (NEPAq), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

³ Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

⁴ Departamento de Engenharia de Pesca e Ciências Biológicas, Universidade do Estado de Santa Catarina, UDESC, Laguna, Brasil

⁵ Departamento de Ciências Naturais, Fundação Universidade Regional de Blumenau, FURB, Blumenau, Santa Catarina, Brasil

Artigo submetido à revista *Science of the total Environmental* (QUALIS-1; IF: 10.753).

Highlights

- Foram detectados os níveis de 75 compostos em ostras *C. gasar*
- Indução de genes *CYP450* e *SULT* em resposta a contaminantes antropogênicos nos diferentes locais
- Aumento nas atividades SOD, CAT e GPx indicam condições pró-oxidantes nas regiões centro-norte
- Ostras de Florianópolis apresentaram maior susceptibilidade a danos oxidativos nas brânquias

- Alterações nos biomarcadores podem estar associadas aos contaminantes e às variáveis ambientais

Abreviaturas

AB: antibiótico; CEs: contaminantes emergentes; *CYP1A1-like*, Citocromo P4501A1-like; *CYP2A1-like*; *CYP356A1-like*: Citocromo 356A1-like; *GSTO-like*: Glutathione ômega-like, DE: desreguladores endócrinos; Glutathione S-Transferase Omega 4A-like; HPA: hidrocarboneto policíclico aromático; OCP: pesticidas organoclorados; ODS: objetivos do desenvolvimento sustentável; PCB: bifenilas policloradas; PEST: pesticidas; POPs: poluentes orgânicos persistentes; *SULT-like*; Sulfotransferase-like, SOD: Superóxido dismutase; CAT: Catalase; GPx: Glutathione peroxidase; GST: Glutathione S-Transferase; AChE: Acetilcolinesterase; HSP70: Heat Shock Protein subunit 70.

Resumo

Os ambientes costeiros são considerados os principais receptores de poluentes antropogênicos. Santa Catarina (SC, Brasil) se destaca por sua economia diversificada, que abrange setores como agricultura, indústria, turismo, pesca e aquicultura, resultando na 6ª maior renda nacional. Neste estudo, avaliamos os níveis de CEs e POPs em ostras nativas *Crassostrea gasar* coletadas em diferentes áreas costeiras de SC durante a temporada de verão. Os animais foram coletados em 8 diferentes pontos situados nas regiões de São Francisco do Sul, Itajaí, Grande Florianópolis e Laguna. Detectamos os níveis de 75 contaminantes nos tecidos moles de ostras *C. gasar*, incluindo antibióticos (AB), desreguladores endócrinos (DE), anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), bifenilas policloradas (PCBs) e pesticidas. Além disso, avaliamos as respostas de biomarcadores envolvidos na biotransformação, defesa antioxidante, proteção ao choque térmico e dano oxidativo nas brânquias das ostras. Nossos resultados demonstraram que os ambientes costeiros de SC sofrem impactos significativos de diversos poluentes. Os contaminantes emergentes foram quantificados em todas as áreas, sendo mais prevalentes nas regiões central e sul do estado. Por outro lado, as concentrações mais elevadas de POPs foram encontradas nas regiões centro-norte do litoral. Esses resultados estão associados à maior urbanização nestas zonas. Em resposta ao gradiente de poluição, ostras *C. gasar* apresentaram uma indução nos sistemas de biotransformação (*CYP2A1-like* e *CYP356A1-like*, *SULT-like* e atividade GST), além de um aumento nas enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx). No entanto, os animais coletados em Florianópolis apresentaram maior susceptibilidade à peroxidação lipídica em comparação às demais regiões. Análises de correlação indicaram possíveis associações entre os contaminantes e as variáveis ambientais na resposta dos biomarcadores avaliados. Os resultados deste estudo evidenciam a influência das atividades antropogênicas no aporte de CEs e POPs em ambientes costeiros de Santa Catarina, fornecendo informações úteis para gestores e auxiliando na tomada de decisões relacionadas à conservação de regiões costeiras.

Palavras-chave: maricultura, produtos farmacêuticos, POPs, estresse oxidativo, biotransformação, poluição aquática

3.1 Introdução

Historicamente, o desenvolvimento humano e econômico esteve intrinsecamente associado à degradação dos ecossistemas (Ali; Oliveira, 2018). Em 1962, o *best-seller* de Rachel Carson (Carson, 1962) despertou a consciência ambiental a respeito de substâncias químicas comumente empregadas nas atividades antropogênicas. Após seis décadas, seu legado continua a ser um ponto de referência no movimento ambientalista global, alertando sobre questões contemporâneas e a importância de se evitar uma “Segunda Primavera Silenciosa” (Arp et al., 2023).

A preocupação global acerca da poluição da água está refletida entre os 17 ODS adotados pelas Nações Unidas (Moallemi et al., 2019). Apesar dos esforços governamentais, estudos em todo o mundo reportam a ocorrência e a distribuição de POPs, em ecossistemas aquáticos, mesmo após mais de 20 anos de sua proibição em tratado internacional estabelecido pela Convenção de Estocolmo (Ademollo et al., 2021; Oliva et al., 2022; Souza et al., 2022; García-Pimentel et al., 2023).

Concomitantemente, novos tipos de substâncias químicas entram nos ambientes aquáticos todos os anos e frequentemente há uma falta de informação a respeito da magnitude e distribuição destes “poluentes escondidos”. Este grupo denominado como contaminantes emergentes (CEs) inclui uma variedade de compostos químicos como produtos farmacêuticos, hormônios, drogas ilícitas, pesticidas, produtos de higiene pessoal e doméstica, aditivos industriais, microplásticos e outros (Marson et al., 2022). Embora estejam presentes em concentrações relativamente baixas no meio ambiente (ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$), estas substâncias têm o potencial de provocar efeitos adversos aos organismos vivos expostos, incluindo toxicidade, carcinogenicidade, desregulação endócrina, resistência bacteriana, entre outros (Marson et al., 2022).

Santa Catarina (SC), localizada na região sul do Brasil ($25^{\circ}57' \text{S}$, $48^{\circ}19' \text{W}$), é o 11º estado mais populoso e possui o 3º maior índice de desenvolvimento humano (IDH) do país (IBGE, 2023). A região costeira de SC, em particular, é uma das áreas mais densamente habitadas do Estado, além de ser polo para diversas atividades econômicas como: portos, indústrias, agricultura, turismo, pesca e aquicultura, entre outras. Em relação à aquicultura, SC lidera a produção de moluscos bivalves no Brasil, representando mais de 90% da produção nacional, com aproximadamente 487 fazendas marinhas credenciadas que cultivam ostras do Pacífico *Crassostrea gigas*, a espécie nativa *C. gasar* e o mexilhão *Perna perna* (Marques et al., 2020).

Apesar de ter uma das maiores economias do Brasil, SC enfrenta desafios em relação ao saneamento básico, com apenas 33% de cobertura na coleta de esgoto e uma baixa relação entre esgoto tratado e água consumida (SNIS, 2023). Essa situação se torna ainda mais problemática durante a alta temporada de turismo no verão, quando a população nas áreas litorâneas aumenta significativamente. Estudos recentes reportaram a ocorrência de contaminantes persistentes (Pessati et al., 2016; Bastolla et al., 2022) e emergentes (Pisetta et al., 2022; Bosch-Orea et al., 2023) em diferentes matrizes coletadas em ambientes estuarinos e marinhos do estado, evidenciando o precário saneamento básico como um problema de saúde pública, ambiental e econômico.

A integração das análises químicas e a avaliação de biomarcadores em espécies sentinelas, abrangendo diferentes níveis de organização biológica é uma ferramenta útil para a gestão ambiental costeira. Estas abordagens têm o potencial de prevenir e alertar sobre potenciais impactos na biota aquática e à saúde humana. Na literatura, experiências bem sucedidas de programas de monitoramento semelhantes ao “*Mussel Watch*” (Farrington et al., 2016) são descritas em diversos países, incluindo os Estados Unidos (Melwani et al., 2014), França (Briand et al., 2023), Espanha (Santos-Echeandía et al., 2021), África (Sparks et al., 2014), Canadá (King et al., 2023) e Brasil (Rios et al., 2016).

Nosso objetivo aqui foi monitorar (qualitativa e quantitativamente) os níveis de diferentes classes de contaminantes emergentes (antibióticos, desreguladores endócrinos e anti-inflamatórios não-esteroidais) e persistentes (HPAs, PCBs e pesticidas) em ambientes costeiros de Santa Catarina e seus possíveis efeitos nos sistemas de biotransformação (fase I e II), defesa antioxidante e proteção ao choque térmico em ostras *Crassostrea gasar*. Os resultados gerados no presente estudo podem evidenciar o risco ambiental decorrente da urbanização e a carência de saneamento básico no litoral de Santa Catarina, além de subsidiar a tomada de decisões em programas de biomonitoramento ambiental.

3.2 Material e métodos

3.2.1. Áreas de estudo

As áreas selecionadas para o presente estudo contemplam quatro regiões costeiras de Santa Catarina: 1) Região Norte: São Francisco do Sul, 2) Região Vale do Itajaí, 3) Região Central: Florianópolis (Baías Norte e Sul) e 4) Região Sul: Complexo Estuarino de Laguna (LG-A) e estão ilustradas na Figura 1. A localização e descrição dos pontos de amostragem estão demonstrados na tabela S-2.

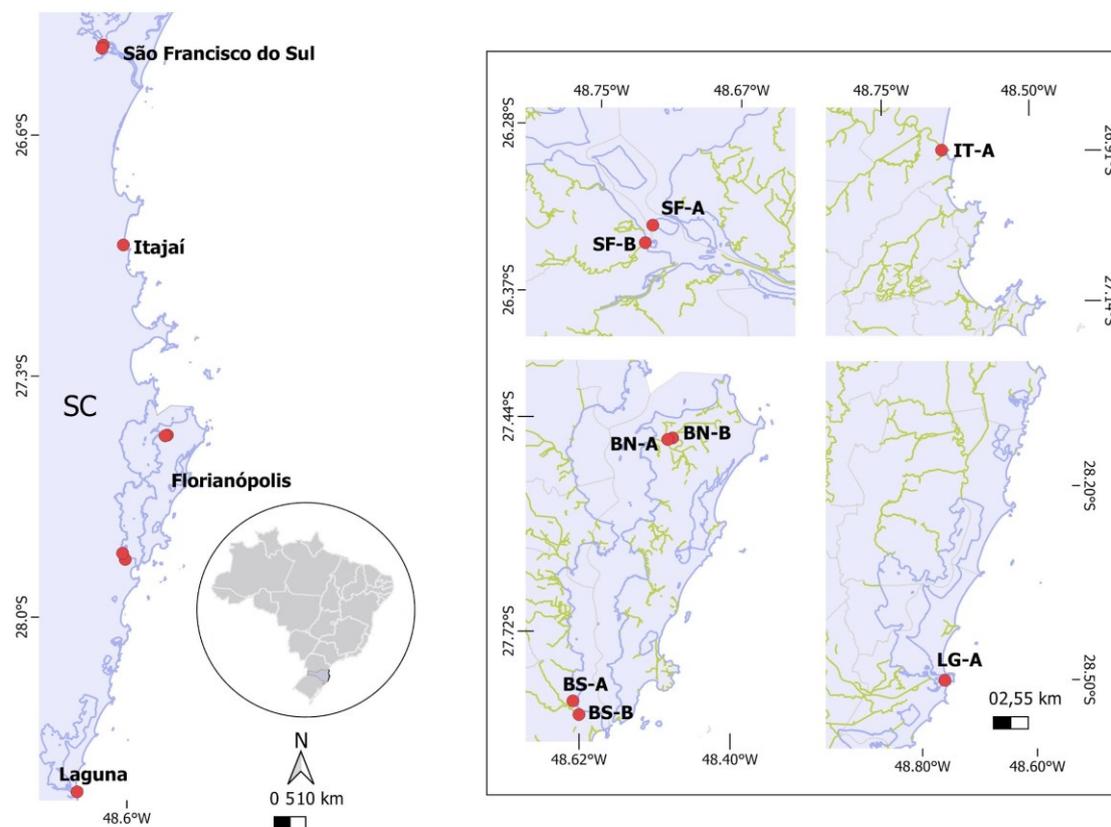
O município de Laguna (LG-A), localizado no litoral-sul de SC, é o segundo município mais populoso da região, com uma população de 42.785 habitantes e densidade demográfica de 128,38 hab/km² (IBGE, 2022). A economia local é fundamentada na pesca, turismo e comércio, pecuária, agricultura. O estuário é fortemente influenciado pelos rios Tubarão e D'uma que funcionam como fontes de água e contaminantes antropogênicos gerados a montante, como mineração, agricultura e manutenção de gado (Santa Catarina, 2018).

A região metropolitana de Florianópolis, situada na região central do litoral de SC, abriga a maior população do estado (ultrapassando 1 milhão de habitantes) distribuída em seis municípios (IBGE, 2022). A rede hidrográfica desta região é composta pelas bacias hidrográficas de Tijucas, Biguaçu, Cubatão e Madre, que deságuam nas baías norte (BN-A e BN-B) e sul (BS-A e BS-B) de Florianópolis, contribuindo para o aporte de efluentes domésticos, agrícolas e industriais dos municípios vizinhos São José, Biguaçu e Palhoça (Silveira; Bonetti, 2019).

Itajaí (IT-A), no litoral centro-norte catarinense, é o quinto município mais populoso do estado, com 264.054 habitantes e altamente urbanizado (913 hab/km²) (IBGE, 2022). A região desempenha papel significativo na economia catarinense, contribuindo com quase 7,5% do PIB estadual, principalmente devido ao Porto de Itajaí, o segundo maior complexo portuário em movimentação de contêineres do Brasil. Além disso, o turismo e as atividades industriais (logística, naval e pesqueira) impulsionam a economia local (SEBRAE, 2019a). Itajaí é influenciada pela bacia hidrográfica do Rio Itajaí-Açú, cujos rios não desaguam diretamente no oceano, mas convergem para o Rio Itajaí-Açú, que deságua nas Baías de Babitonga e Itajaí (Santa Catarina, 2018).

São Francisco do Sul (SF-A e SF-B) é o terceiro município mais populoso do litoral norte de Santa Catarina (52.674 habitantes) (IBGE, 2022). Semelhante à Itajaí, a atividade portuária também desempenha um papel importante nesta região, sendo operada nos portos de São Francisco do Sul e Itapoá. (SEBRAE, 2019b). As bacias dos rios Cubatão e Itapocu pertencem ao complexo hídrico da Baía da Babitonga, os quais abrangem 6 municípios, incluindo São Francisco do Sul (Santa Catarina, 2018). Ambos os rios possuem importância para abastecimento urbano, bem como irrigação agrícola.

Figura 1. Mapa das áreas selecionadas para o monitoramento de contaminantes persistentes e emergentes em Santa Catarina (Sul, Brasil).



Descrição: Região Central: Florianópolis - Baía Norte, no Rio Ratoles: Ponto A (BN-A); Ponto B (BN-B); Florianópolis - Baía Sul, no Rio Maciambu: Ponto A (BS-A); Ponto B (BS-B); Região Sul: Laguna, na Lagoa no Noca: Ponto A (LG-A); Região do Vale: Itajaí, no rio Itajaí-Açu, ponto A (IT-A); Região Norte: São Francisco do Sul, na Ilha dos Barcos: Ponto A (SF-A), e o Ponto B (SF-B): Ilha Comprida.

3.2.2. Coleta do material biológico

Durante a alta temporada de verão de 2022 foram coletadas as ostras *C. gasar* ($n = 58$) residentes em SF-A ($n = 8$), SF-B ($n = 8$), IT-A ($n = 8$), BN-A ($n = 6$), BN-B ($n = 8$), BS-A ($n = 4$), BS-B ($n = 8$) e LG-A ($n = 8$) para avaliação dos biomarcadores bioquímicos e moleculares e quantificação de POPs e CEs. Foram coletados os parâmetros de qualidade de água como pH, salinidade, condutividade, oxigênio dissolvido, temperatura da água e ar com o auxílio de uma sonda multiparâmetro (Instrumentos de Medição Akso, modelo AK88). Após as coletas de campo, as ostras foram transportadas até o LABCAI (UFSC, Florianópolis, Brasil) onde parte das brânquias foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriores análises de biomarcadores e confirmação molecular das espécies, baseado em Pie et al (2006) (procedimento descrito no Material suplementar, SI 2). O restante dos tecidos moles dos animais foi encaminhado para o CETAq (FURB, Blumenau, Brasil), onde foram armazenadas em freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h até o processamento para as análises químicas.

3.2.3. Análises dos contaminantes

Com vistas a uma avaliação abrangente acerca da poluição em áreas costeiras de Santa Catarina, foi realizado um monitoramento de contaminantes emergentes e poluentes orgânicos persistentes (POPs) nos tecidos moles de ostras *C. gasar* (*pool* de 4 ostras por local), totalizando 75 compostos. Informações acerca do processamento de amostras, análises químicas e lista de todos os contaminantes quantificados estão descritas no Material Suplementar (Informações Suplementares, SI 1). Para avaliação da ocorrência de poluentes orgânicos persistentes foram quantificados os níveis dos seguintes compostos: 33 pesticidas, 18 congêneres de PCBs e 13 HPAs. Quanto ao monitoramento de contaminantes emergentes, foram quantificadas as seguintes categorias: antibióticos (eritromicina, sulfametoxazol, ciprofloxacina e azitromicina), anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (ibuprofeno, acetaminofeno, ácido salicílico e furosemida) e compostos desreguladores endócrinos (E1: estrona, E2: estradiol, E3: estriol, EE2: 17 α - etinilestradiol, progesterona). As concentrações de contaminantes foram expressas em ng g⁻¹ de peso úmido.

3.2.4. Extração de RNA total, transcrição reversa e avaliação dos níveis de transcritos via RT-qPCR

A extração do RNA total das amostras de brânquias (n = 10 ostras, 80 mg de tecido) foi realizada com o reagente Qiazol (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante com pequenas modificações. A pureza e a concentração do RNA total foram quantificadas por espectrometria em NanoDrop®ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). A transcrição reversa foi realizada utilizando o Kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de cDNA foram diluídas e armazenadas em freezer a -20°C para posteriores análises moleculares. Neste estudo avaliamos os níveis de transcritos de 5 genes envolvidos na fase I (*CYP1-like*, *CYP2A1-like*, *CYP356A1-like*) e II (*SULT-like* e *GSTO-like*) de biotransformação de xenobióticos. As sequências de oligonucleotídeos utilizadas para a construção dos iniciadores e os critérios de construção estão demonstrados no Material suplementar (Tabela S-1 e SI 3, respectivamente). A avaliação dos níveis de mRNA foi realizada pelo kit QuantiNova SYBR Green PCR (Qiagen) e quantificada usando o termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen). O produto de PCR foi analisado e submetido à análise de *melting*. A eficiência da reação (E) foi determinada para cada par de iniciadores e confirmada através da curva de calibração do cDNA. A normalização para cada gene alvo foi realizada de acordo com Rhinn et al (2008), com base na concentração de cDNA

presente nas amostras. Todos os dados foram calibrados pelos níveis de mRNA de ostras coletadas em LG-A e os resultados foram analisados pelo método 2^{-Cq} (Schmittgen; Livak, 2008).

3.2.5. Processamento das amostras e ensaios dos biomarcadores bioquímicos

As brânquias das ostras foram pesadas (100 mg) e homogeneizadas (1:4, p/v) em tampão de homogeneização (0,1 M TRIS-HCl, pH 7,4, contendo 0,5 M de sacarose; 0,15 M KCl; 1 mM DTT) e submetidas a 9.000 g centrifugação por 30 min a 4°C. O sobrenadante (fração citosólica) foi separado em alíquotas e congelado a -80 °C para ensaios de atividades enzimáticas e imunodeteção de HSP70. A concentração de proteínas totais dissolvidas na fração citosólica foi determinada conforme metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão. A atividade da catalase (CAT) foi quantificada conforme descrito por Aebi (1984), medida pela decomposição do peróxido de hidrogênio a 240 nm ($\epsilon = 0,0436 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A atividade Glutationa Peroxidase (GPx) foi determinada de acordo com Wendel (1981) através da decomposição de hidroperóxido de cumeno (Cu-OOH) em 340 nm. A atividade total da Glutationa S-transferase (GST) foi realizada conforme Keen (1976) através da formação do conjugado GS-DNB, monitorada a 340 nm ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). De acordo com Ellman et al. (1961), a atividade catalítica de colinesterases (AChE) foi quantificada através da conjugação de tiocolina com 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) medido a 412 nm ($\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A peroxidação lipídica foi realizada conforme descrito por Almeida et al. (2007), baseada pela quantidade de produto formado pela reação de malondialdeído (MDA) e ácido tiobarbitúrico a 535 nm.

3.2.6. Imunodeteção da Proteína de Choque Térmico (HSP70)

A quantificação de HSP70 em brânquias de ostras por *western blotting* foi realizada conforme descrito por Yang et al (2016). Proteínas citosólicas (20 μg) foram separadas em géis SDS-PAGE a 1% e depois transferidas eletroforéticamente para membrana de nitrocelulose de 0,2 μm e bloqueadas com solução bloqueadora a 5% (Tris-Buffer pH 7,5 e leite ultrapuro). O anticorpo primário HSP 70 Monoclonal Antibody 3A3 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Ref: MA3-006) foi diluído 1:6000 em solução de bloqueio a 5% (v/v). O anticorpo secundário conjugado com *horseradish* peroxidase (HRP) (RPN2108, Cytiva) *anti-mouse* foi diluído 1:2500 em solução de bloqueio a 3% (v/v). As bandas de proteína foram detectadas de acordo com o Kit Clarity Western ECL Blotting Substrate (Bio-Rad) para quimioluminescência e

visualizadas pelo Fotodocumentador Chemidoc MP (Bio-Rad). Para as análises de western blotting, o cálculo do sinal quimioluminescente de HSP70 foi realizado no Software Image Lab 6.0 (Bio-Rad).

3.2.7. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism® versão 7.00. Os dados dos níveis de transcritos e de atividade enzimática estão apresentados na forma de média \pm desvio padrão. A identificação dos *outliers* nos dados foi realizada através do teste de Grubbs. A verificação da normalidade e homocedasticidade dos dados foi realizada através dos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Para avaliar as diferenças nas respostas dos biomarcadores entre as ostras coletadas nos diferentes pontos foi aplicada ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey (nível de significância $p < 0.05$). Para dados não-paramétricos foi aplicada Kruskal-Wallis seguida de pós-teste de Dunn's (nível de significância $p < 0,05$). Para avaliar a correlação entre as classes de contaminantes, variáveis ambientais e os biomarcadores foram realizados testes de correlação de Pearson. Os testes foram executados no software R (versão 4.1.2) associado ao *RStudio* (versão 2021.9.0.351), com o pacote *corrplot*, nível de significância de 0.05 e observados na forma de correlogramas.

3.3 Resultados e discussão

3.3.2. Níveis de contaminação e distribuição geográfica de CEs em ostras *C. gasar*

A ocorrência, distribuição geográfica e concentrações totais (ng g^{-1} peso úmido) de DE, AB e AINEs estão apresentados na Figura 2 e na tabela suplementar S-5. Em nosso estudo, Σ DE foram detectados em aproximadamente 75% das amostras (1,18 a 3,83 ng g^{-1} peso úmido), com concentrações na seguinte ordem decrescente: LG-A > SF-B > BS-A > IT-A > SF-A > BN-A. Entre os compostos, observamos uma maior ocorrência de E1 (0,31 a 0,80 ng g^{-1} peso úmido), seguido de EE2 (0,21 a 1,82 ng g^{-1} peso úmido), prednisona (0,87 a 1,39 ng g^{-1} peso úmido) e prednisolona (0,58 a 0,84 ng g^{-1} peso úmido) nos respectivos pontos monitorados. Os níveis de E2, E3 e progesterona estavam abaixo do limite de detecção do método.

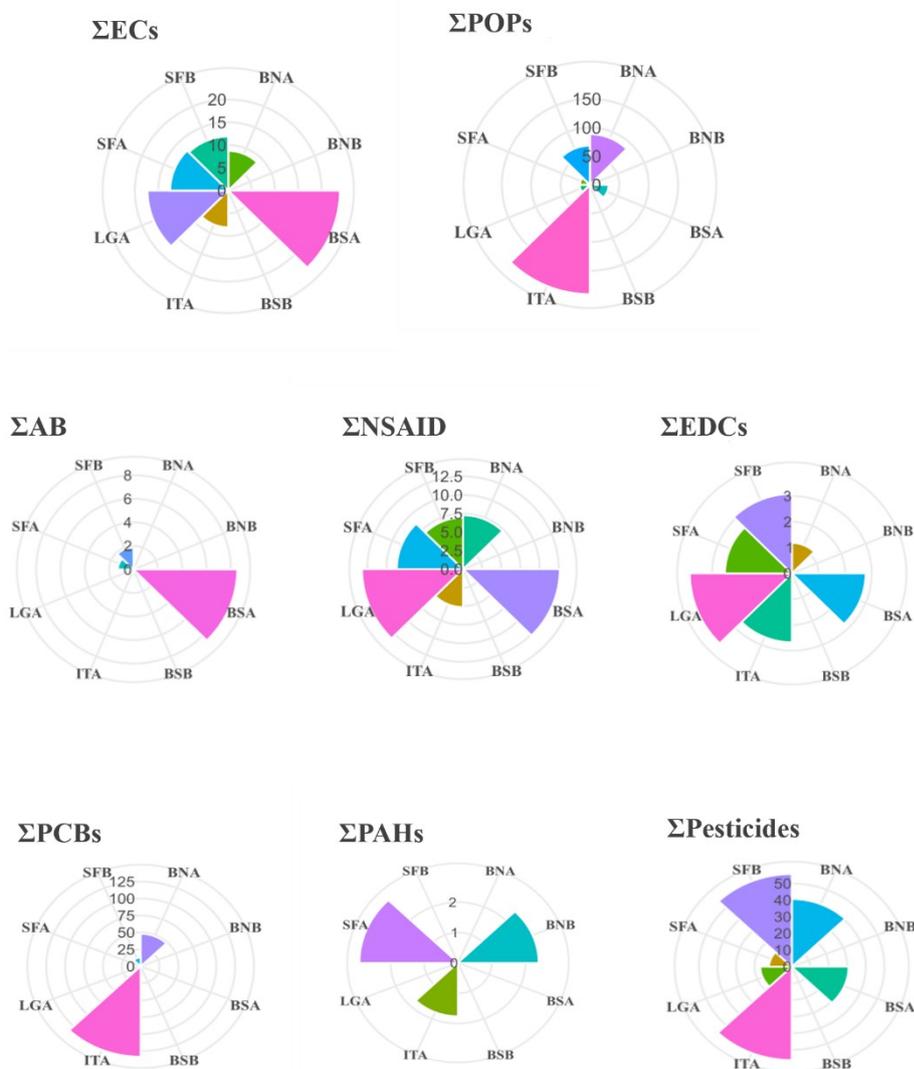
Compostos estrogênicos (E1, E2, E3 e EE2) são considerados grupo prioritário para o monitoramento de esteroides (“Decisão de Implementação da Comissão (UE) 2018/840,” 2018) devido ao potencial risco de desregulação endócrina. Em nosso trabalho, observamos concentrações mais elevadas de E1 (1,38 a 3,23 ng g^{-1} peso úmido) e EE2 (0,43 a 3,64 ng g^{-1} peso úmido) em ostras de LG-A, IT-A, SF-B e BS-A (Tabela S-5).

Os estrógenos E1, E2 e E3 são compostos endógenos que desempenham papel fundamental no desenvolvimento do sistema reprodutivo feminino, enquanto que EE2 é um composto sintético frequentemente empregado como princípio ativo em medicamentos contraceptivos e agentes terapêuticos de reposição hormonal (revisado por Adeel et al., 2017).

Concentrações similares de EE2 (3 e 17 ng g⁻¹ peso seco) foram reportadas em *Mytilus galloprovincialis* coletados na lagoa de Veneza (Itália) (Pojana et al., 2007). Por outro lado, os resultados encontrados neste trabalho são menores (entre 10 a 100 vezes) em relação aos níveis de bioacumulação reportados para mexilhões coletados em Hong Kong (Xu et al., 2016) e em diferentes regiões costeiras da China (Chiu et al., 2018).

Coello-Garcia et al (2019) sugerem que E1 e EE2 apresentam menores taxas de biodegradação entre os compostos estrogênicos, o que pode explicar sua prevalência em águas superficiais, conforme relatado em trabalhos anteriores (Sami; Fatma, 2019, Pratush et al., 2020) e no presente estudo, especialmente considerando que E1 também é um subproduto do processo de biotransformação de E2 (Khanal et al., 2006).

Figura 2. Gráfico de radar das concentrações totais de contaminantes emergentes (Σ ECs: antibióticos, compostos desreguladores endócrinos e anti-inflamatórios não esteróides) e persistentes (Σ POPs: PAHs, PCBs e pesticidas) (ng g⁻¹ peso úmido) avaliados em ostras *C. gasar* coletadas em diferentes regiões de Santa Catarina: São Francisco do Sul (SF-A e SF-B), Itajaí (IT-A), Baías Norte (BN-A e BN-B) e Sul (BS-A e BS-B) de Florianópolis e Laguna (LG-A).



Nos últimos anos, a bioacumulação de esteróides e sua funcionalidade em moluscos têm sido alvo de discussão (Scott, 2012; 2013, Balbi et al., 2019). A ocorrência de esteróides em bivalves é fundamentada em duas hipóteses: 1) vias de biossíntese, 2) assimilação a partir do ambiente externo. Trabalhos recentes sugerem que a absorção de esteróides disponibilizados nos ecossistemas aquáticos, por meio de conjugação com ácidos graxos, seja um mecanismo viável em moluscos (Schwarz et al., 2017, Guercia et al., 2017, Bai; Acharya, 2018). Neste contexto, sugere-se que os níveis de esteróides, tanto naturais quanto sintéticos, observados neste estudo estejam relacionados a maior disponibilidade destes compostos nos locais de monitoramento.

Além das terapias hormonais, os esteróides também são frequentemente utilizados na medicina humana e veterinária para o tratamento de doenças crônicas. Os glicocorticóides (GC), como prednisona e prednisolona, apresentam eficácia no tratamento de doenças inflamatórias, insuficiência adrenocortical, alergias, artrite reumatóide e asma (Kugathas et al., 2012). Neste trabalho, ostras *C. gasar* coletadas em IT-A, São Francisco do Sul (SF-A e SF-B) e LG-A apresentaram maiores níveis de prednisona (valores entre 1,21 e 1,39 ng g⁻¹ peso úmido) em relação à BN-A e BS-A (0,87 e 0,99 ng g⁻¹ peso úmido, respectivamente). Em contrapartida, os níveis de prednisolona foram detectados apenas em animais coletados na baía sul de Florianópolis (BS-A: 0,84 ng g⁻¹ peso úmido), SF-A e SF-B (0,58 e 0,83 ng g⁻¹ peso úmido, respectivamente).

Estudos reportam maior ocorrência de prednisona e prednisolona em ambientes aquáticos em relação a outros GC sintéticos (Reis et al., 2019; Shen et al., 2020; Gong et al., 2023), entretanto, os dados de bioacumulação em bivalves marinhos ainda são limitados na literatura. Prednisona é um composto farmacologicamente inerte que requer biotransformação hepática para produção de prednisolona, sua forma terapeuticamente ativa. Neste contexto, hipotetizamos que a maior ocorrência de prednisona pode estar relacionada ao descarte inadequado de medicamentos. Zhou et al (2016) relataram concentrações similares ao nosso estudo (< 3,2 ng g⁻¹) no Lago Taihu (China).

3.3.2.2. Antibióticos

Os antibióticos (AB) constituem uma diversa classe de agentes quimioterápicos comumente empregados no tratamento de infecções bacterianas em seres humanos e animais, além de ser utilizados como promotores de crescimento na criação de animais (Kümmerer, 2009). Além do lançamento de esgoto doméstico em ambientes costeiros, atividades como a pecuária e aquicultura também são consideradas fontes de entrada de AB (Bilal et al., 2020).

Em nosso estudo, as concentrações Σ AB variaram entre 1,29 a 8,52 ng g⁻¹ peso úmido (tabela S-5) e apresentaram maior ocorrência nas ostras coletadas em BS-A, SF-B e SF-A, respectivamente. Nos demais locais monitorados (BN-A, LG-A, IT-A) os níveis de Σ AB foram 0,29 ng g⁻¹ peso úmido. Entre os AB, eritromicina não foi detectado em nenhum dos pontos monitorados. Os níveis de ciprofloxacina foram maiores nas ostras coletadas nas baías norte e sul de Florianópolis (BN-A e BS-A, respectivamente), IT-A e LG-A (variando entre 0,23 e 0,39 ng g⁻¹ peso úmido). Essas concentrações são baixas quando comparadas ao estudo conduzido

por Li et al (2012) no Mar de Bohai (China), onde moluscos bivalves apresentaram níveis de bioacumulação de ciprofloxacina entre 14,54 ng g⁻¹ peso úmido.

Em contrapartida, as ostras coletadas na região de São Francisco do Sul (SF-A e SF-B) apresentaram maiores níveis de sulfametoxazol (0,91 e 1,47 ng g⁻¹ peso úmido) em relação às demais localidades. Chen et al (2015) relataram valores similares de sulfametoxazol em áreas de aquicultura na Ilha de Hailing (China), com concentrações variando entre 0,4 e 2,4 ng g⁻¹ peso seco. Na et al (2013) também reportaram concentrações similares (nd a 2,27 ng g⁻¹ peso seco) em bivalves coletados na região Dalian (China). De acordo com Carvalho & Santos (2016), as classes fluoroquinolonas e sulfonamidas, como o sulfametoxazol e a ciprofloxacina, são consideradas as drogas bacteriostáticas mais prescritas globalmente, sendo frequentemente detectadas em ecossistemas aquáticos.

Interessantemente, os níveis de azitromicina foram detectados apenas nas ostras de BS-A (8,52 ng g⁻¹ peso úmido), entretanto, em concentrações aproximadamente 10 vezes superiores aos demais AB. As concentrações encontradas em nosso trabalho são consideradas altas (2,5 a 10 vezes) em comparação ao estudo de Granek et al (2016), onde os níveis de bioacumulação de azitromicina em ostras *Ostrea lurida* coletadas em Oregon (USA) variaram entre 0,9 e 3,2 ng g⁻¹ peso úmido. Por outro lado, Alvarez-Muñoz et al (2015b) relataram concentrações similares ao nosso estudo (valores entre 11,8 e 13,3 ng g⁻¹ peso seco, respectivamente) em *Mytilus spp* coletados no estuário Tagus (Itália) e Delta Po (Espanha).

Fatores como o coeficiente de partição octanol-água (log K_{ow}) e as taxas de excreção dos compostos podem estar associadas às diferenças no perfil de AB detectados neste estudo. A maior bioacumulação de azitromicina observada em LG-A pode estar relacionada ao potencial de bioacumulação superior deste composto (AZT = log K_{ow} 4.8) em relação à ciprofloxacina e sulfametoxazol (log K_{ow} = 0.28 e 0,89, respectivamente). Por outro lado, Mompelat et al. (2009) relataram taxas de excreção mais altas para ciprofloxacina (50 a 80%) e sulfametoxazol (15 a 30%, respectivamente) em relação à eritromicina (5 a 10%). Neste sentido, hipotetizamos que taxas de excreção mais elevadas destes compostos podem estar associadas à maior disponibilidade e, portanto, favorece a bioacumulação nas ostras coletadas neste estudo.

3.3.2.3. Anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs)

Concentrações mais elevadas de ΣAINEs foram observadas em LG-A (13,19 ng g⁻¹ peso úmido), BS-A (12,63 ng g⁻¹ peso úmido), SF-A (8,65 ng g⁻¹ peso úmido), BN-A (7,25 ng g⁻¹

peso úmido) e SF-B (6,96 ng g⁻¹ peso úmido), respectivamente. De maneira geral, observamos uma maior ocorrência de ibuprofeno (2,61 ng g⁻¹ a 5,91 ng g⁻¹ peso úmido), ácido salicílico (2,2 a 5 ng g⁻¹ peso úmido) e acetaminofeno (0,5 a 1,83 ng g⁻¹ peso úmido), respectivamente, em relação aos demais AINEs monitorados no presente estudo.

Ibuprofeno foi o AINEs mais predominante em 5 dos 8 locais de monitoramento: BS-A (5,91 ng g⁻¹ peso úmido), BN-A (3,75 ng g⁻¹ peso úmido), SF-A (3,74 ng g⁻¹ peso úmido), IT-A (2,91 ng g⁻¹ peso úmido) e SF-B (2,61 ng g⁻¹ peso úmido). Derivado do ácido propiônico, IBU é frequentemente prescrito devido sua ação anti-inflamatória, antipirética e analgésica (Upadhyay et al., 2021). Concentrações similares ao presente estudo foram observadas em *Mytilus edulis* (nd a 5,4 ng g⁻¹ peso úmido) e *Anomalocardia brasiliiana* (nd a 8,2 ng g⁻¹ peso úmido) coletados em regiões costeiras (Nordeste, Brasil) (Mello et al., 2022). Níveis mais elevados de bioacumulação de IBU foram detectados em *M. galloprovincialis* coletados no Mar Adriático (9,39 ng g⁻¹ peso seco) (Mezzelani et al., 2016) e Mar Tirreno (8 a 143 ng g⁻¹ peso seco) (Mezzelani et al., 2020).

Ácido salicílico (AS) é a forma farmacologicamente ativa do ácido acetilsalicílico (AAS), conhecido comercialmente por aspirina. Em nosso estudo, a ocorrência de AS apresentou distribuição geográfica similar ao ibuprofeno: BS-A > BN-A > SF-A > SF-B > IT-A (2,2 a 5,0 ng g⁻¹ peso úmido). Esses resultados são menores em relação ao estudo conduzido por Wille et al (2011), que variou entre 14 a 288 ng g⁻¹ peso seco, em *Mytilus spp* transplantados durante 6 semanas em áreas costeiras poluídas na Bélgica. Castaño-Ortiz et al (2023) também relataram concentrações mais elevadas de AS (variando entre 10 e 52 ng g⁻¹ peso seco) em biomonitoramento realizado na Lagoa Mar Menor (Região Espanha).

Alternativamente, os níveis de furosemida (FUR) foram detectados apenas nas ostras provenientes de SF-A (0,10 ng g⁻¹ peso úmido), enquanto que acetaminofeno (ACT) foi detectado nas ostras de São Francisco do Sul (SF-B e SF-A) (1,8 ng g⁻¹ peso úmido) e Florianópolis (BS-A e BN-A, 1,65 e 0,50 ng g⁻¹ peso úmido, respectivamente).

ACT, conhecido comercialmente por paracetamol, é o principal analgésico e antipirético de venda livre amplamente utilizado no mundo todo e prescrito para tratamento pediátrico (Offor et al., 2022), enquanto que FUR é um diurético de alça utilizado para o tratamento de hipertensão, insuficiência cardíaca, hepática (Tuttolomondo et al., 2016). Neste estudo observamos menores níveis de ACT e FUR quando comparados aos estudos de Burket et al (2019) (ACT: 6 e 347 ng g⁻¹ peso úmido em *C. fluminea*) e Granek et al (2016) (nd a 18,7 ng g⁻¹ peso úmido), regiões impactadas por efluentes domésticos no Condado de Denton (Texas, USA) e em Oregon (USA).

3.3.2. Níveis de contaminação, composição e distribuição geográfica dos POPs em ostras

C. gasar

Os resultados acerca das concentrações (ng g^{-1} peso úmido) de poluentes orgânicos persistentes detectados nos locais de monitoramento estão apresentados na tabela S-6 a S-8. Em uma visão global dos pontos monitorados, os pesticidas e PCBs foram os mais frequentemente detectados (presentes em 75% das amostras), seguido por HPAs (detectados em 37,5% das amostras).

As maiores concentrações totais de pesticidas (Σ PEST) foram observadas nos animais provenientes da região norte (SF-B e IT-A) (55,6 e 56,1 ng g^{-1} peso úmido, respectivamente) e central (BN-A e BS-A) (30,7 a 40,6 ng g^{-1} peso úmido, respectivamente) do estado em relação às demais localidades monitoradas. Em SF-A e LG-A, as concentrações totais variaram entre 12,21 a 16,94 ng g^{-1} peso úmido, respectivamente. Não foram detectados níveis Σ PEST nas ostras coletadas em BN-B e BS-B.

O Brasil é o maior consumidor mundial de pesticidas, com diversos compostos comumente empregados na agricultura, saúde pública e em outros setores (Albuquerque et al., 2016). A fim de facilitar a discussão acerca da ocorrência dos compostos detectados no presente estudo, adotamos a seguinte classificação: 1) resíduos de pesticidas banidos, principalmente pesticidas organoclorados (OCPs) e 2) pesticidas utilizados atualmente (do inglês, *current-use pesticides - CUPs*).

Pesticidas organoclorados (OCPs) incluem uma diversidade de compostos que foram amplamente utilizados entre 1950 a 1980, como parte do pacote tecnológico de modernização da agricultura em SC (Carvalho et al., 2017). OCPs podem ser divididos em dois principais grupos: ciclodienoclorados (aldrin, dieldrin, endrin, heptacloro, clordano e endosulfan) e compostos do tipo DDT (DDE, DDD e DDT). Em razão da toxicidade, carcinogenicidade e potencial de transporte de longo alcance, os OCPs foram banidos em vários países, incluindo o Brasil, e regulamentados pela Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes (Brasil, 1985).

Apesar disso, estudos recentes reportam a ocorrência destes compostos banidos em diferentes matrizes ambientais, evidenciando a respectiva persistência, potencial de bioacumulação e de biomagnificação (Vieira et al., 2019, Souza et al., 2022, Morgado et al., 2023). Em consonância, detectamos os níveis destes compostos em todos os pontos de monitoramento neste estudo. Os animais provenientes de SF-B, IT-A e BN-A, locais onde quantificamos as maiores concentrações Σ PEST, também apresentaram maior ocorrência de OCPs e seus derivados, como: heptacloro (0,08 a 2,89 ng g^{-1} peso úmido), heptacloro epóxido

(0,69 a 22,67 ng g⁻¹ peso úmido), clorobenzilato (0,2 a 9,73 ng g⁻¹ peso úmido), dieldrin (nd a 4,42 ng g⁻¹ peso úmido), pentaclorobenzeno (0,27 a 8,9 ng g⁻¹ peso úmido), metolacoloro (0,04 a 9,64 ng g⁻¹ peso úmido) e 1,2,4,5-tetraclorobenzeno (29,49 ng g⁻¹ peso úmido).

Heptacloroepóxido é um produto primário resultante da degradação do heptacloro, que apresenta maior persistência e toxicidade em relação ao composto parental (Gao et al., 2008). Após ser disponibilizado no meio ambiente, aproximadamente 20% do heptacloro lançado no meio ambiente é transformado em heptacloroepóxido, o qual é fortemente adsorvido em sedimentos e bioacumulados em organismos aquáticos (ATSDR, 2007). Os resultados observados no presente estudo evidenciam a significativa persistência destes compostos outrora empregados extensivamente, e que podem apresentar meia-vida em solo estimada entre 150 dias e 17 anos (PPDB, 2014).

Por outro lado, os CUPs compreendem uma diversidade de compostos e classes químicas, que podem apresentar menor persistência e potencial de bioacumulação e maior solubilidade em água em relação aos OCPs. Os piretróides, como a permetrina, compreendem uma das três principais categorias de pesticidas e têm sido amplamente empregados em todo o mundo desde os anos 1980 (Tang et al., 2018). Além do uso na agricultura, a permetrina (*cis* e *trans*) é também frequentemente utilizado para fins de dedetização em áreas residenciais, na indústria têxtil, tratamento de ectoparasitas na medicina humana e veterinária, e controle de vetores de saúde pública (Anadón et al., 2009; Estep et al., 2018; Salimi et al., 2021; Zverev et al., 2023).

Em nosso estudo foram detectados níveis menores de *trans*-permetrina (0,05 a 0,8 ng g⁻¹ peso úmido) em comparação ao isômero *cis*. Ostras *C. gasar* coletadas em SF-B apresentaram maiores níveis de *cis*-permetrina (22,15 ng g⁻¹ peso úmido) em relação aos demais pontos (0,04 a 0,64 ng g⁻¹ peso úmido). Apesar de inéditos no contexto de Santa Catarina, estudos prévios reportaram concentrações similares ou superiores de permetrina em organismos aquáticos cultivados ao redor do mundo. Firth et al. (2019) detectaram níveis semelhantes de *cis*-permetrina (variando entre 33,7 a 35,6 ng g⁻¹ peso seco) em mexilhões *M. galloprovincialis* e *Choromytilus meridionalis* cultivados na Baía Saldanha (África). Petrarca et al. (2022) relata concentrações residuais de permetrina (53,5 µg kg⁻¹ peso seco) em *M. edulis* coletados no estuário de Tejo (Portugal) e em mercados locais no entorno.

Segundo os dados do censo agropecuário, o município de São Francisco do Sul possui produção agrícola, em pequena escala, de diferentes culturas (banana, cana-de-açúcar, palmito, arroz e mandioca), de forma que os resultados encontrados em nosso estudo reforçam a

contribuição destas atividades para a contaminação dos corpos hídricos na área entorno (IBGE, 2017).

Compostos organofosforados (OPs), como clorpirifós (CPF), são comumente empregados em atividades agrícolas para controle de insetos vetores, representando 38% do total de pesticidas utilizados globalmente (Singh, 2009). Níveis de bioacumulação de CPF foram observados nas ostras provenientes de IT-A > LG-A > BS-A > SF-A > BN-A > SF-B. Concentrações mais elevadas (~7 a 100 vezes) foram observadas nas ostras coletadas em IT-A (10,38 ng g⁻¹ peso úmido) em relação aos demais pontos (0,1 a 1,48 ng g⁻¹ peso úmido). Masiá et al (2015) encontraram concentrações similares de CPF (1,48 a 11,38 ng g⁻¹ peso seco) em ciprinídeos *Barbus guiraonis* e *Cyprinus carpio*, respectivamente, coletados na Bacia do Rio Llobregat (Catalunha, Espanha). Similarmente, o estudo conduzido por Bashnin et al (2019) reporta níveis de CPF entre 1,79 a 9,25 ng g⁻¹ peso seco em mexilhões *D. polymorpha* transplantados em Gent (Bélgica).

Em relação aos HPAs, observamos menor ocorrência desta classe em nosso estudo, sendo detectados apenas nos animais de SF-A (2,92 ng g⁻¹ peso úmido), BN-B (2,39 ng g⁻¹ peso úmido) e IT-A (1,76 ng g⁻¹ peso úmido). Em ecossistemas aquáticos, as fontes primárias de HPAs incluem derramamentos de óleo (Fernando et al., 2019; Wang et al., 2020), combustão inadequada e/ou incompleta de combustíveis fósseis (Sun et al., 2019), bem como a descarga de efluentes provenientes de atividades industriais e domésticas (Bastolla et al., 2022; Viganò et al., 2023).

No Brasil, não há regulamentação que defina os limites de concentrações de HPAs em peixes e moluscos para fins de monitoramento. De acordo com o NOAA (Administração Oceânica e Atmosférica Nacional), o nível de poluição por HPAs, baseado nos níveis detectados em peixes, pode ser dividido em quatro categorias: local não poluído (<10 ng g⁻¹ peso úmido), local minimamente poluído (10 a 99 ng g⁻¹ peso úmido), local moderadamente poluído (100 a 1000 ng g⁻¹ peso úmido) e local altamente poluído (>1000 ng g⁻¹ peso úmido). Baseado nessa classificação, as concentrações ambientais detectadas neste estudo sugerem que os respectivos locais de monitoramento podem ser considerados “isentos de poluição” por HPAs. Lin et al (2023) detectaram concentrações similares de HPAs em bivalves coletados na região litorânea de Shenzhen (Sul da China) (0,86-9,63 ng g⁻¹ peso úmido).

O padrão de composição de HPAs pode fornecer informações importantes para avaliação ambiental, incluindo indícios sobre potenciais fontes poluidoras, persistência ambiental e níveis de toxicidade associados. De acordo com o número de anéis benzênicos, os

HPAs podem ser divididos em duas categorias: de baixo peso molecular (LMW, 2-3 anéis) e de alto peso molecular (HMW, 4-6 anéis) (Zhang et al., 2020, Sun et al., 2021).

Em SF-A, observamos uma predominância de HPAs de alto peso molecular como BaA (1,25 ng g⁻¹ peso úmido), BaP (0,75 ng g⁻¹ peso úmido) e FLT (0,31 ng g⁻¹ peso úmido) em comparação aos demais pontos e compostos avaliados. Por outro lado, em BN-B e IT-A detectamos concentrações maiores de LMW-HPAs, como ACE (1,31 ng g⁻¹ peso úmido), PHE (0,72 ng g⁻¹ peso úmido) e 2-mNAP (0,06-0,95 ng g⁻¹ peso úmido). Baseado na relação entre $\Sigma\text{LMW}/\Sigma\text{HMW}$, o perfil de bioacumulação de HPAs observados ostras de SF-A ($\Sigma\text{LMW}/\Sigma\text{HMW} = 0,16$) aponta para fontes pirogênicas, como principal contribuinte. Em contrapartida, a relação $\Sigma\text{LMW}/\Sigma\text{HMW}$ em IT-A e BN-B sugere para fontes petrogênicas (valor estimado em 2 e 1,46, respectivamente).

Os resultados encontrados neste estudo são consistentes com as atividades que ocorrem no entorno dos locais de monitoramento (Anyahara, 2021). O ponto IT-A destaca-se devido a sua proximidade à zona portuária, onde ocorre o derramamento de combustíveis fósseis de barcos de pesca e navios ancorados. Por outro lado, o ponto BN-B fica localizado às margens de uma rodovia estadual de alto fluxo de trânsito (SC-401). Ainda que os locais avaliados no presente estudo sejam considerados “isentos de poluição” por HPAs, do ponto de vista regulatório, destacamos que as concentrações ambientais encontradas são passíveis de gerar danos à biota (Gan et al., 2021) e, portanto, merecem atenção.

Os PCBs representam uma categoria diversificada dos POPs (totalizando 209 congêneres) e eram amplamente empregados em diversas aplicações industriais e comerciais, como isolantes elétricos, fluidos dielétricos em transformadores e capacitores, retardadores de chama, lubrificantes, pesticidas e extensores de cera, e aditivos em tintas, plásticos, adesivos (ATSDR, 2000). Devido à sua notável toxicidade e capacidade de bioacumulação, o Brasil proibiu a produção e uso de PCBs em 1981, em consonância com as diretrizes estabelecidas pela Convenção de Estocolmo.

Os perfis composicionais dos PCBs nos tecidos moles de *C. gasar* estão ilustrados na tabela S-8. Concentrações totais de 18 congêneres de PCBs (ΣPCBs) foram detectados em 6 dos 8 locais de monitoramento (IT-A > BN-A > SF-B > SF-A > BS-A > LG-A) e variaram entre 1,25 a 133 ng g⁻¹ peso úmido. Não houve bioacumulação de PCBs nas ostras provenientes de BN-B e BS-B. Esses resultados são comparáveis a biomonitoramentos realizados na Baía de San Diego (Califórnia, 9 a 110 ng g⁻¹ peso seco) (Talley et al., 2022) e em Bangladesh (3,8 a 37,7 ng g⁻¹ peso seco) (Habibullah-Al-Mamun et al., 2019). Por outro lado, as concentrações

ΣPCBs detectadas neste estudo foram maiores em comparação à *C. gasar* coletadas na Baía de Babitonga (Brazil) (Zacchi et al., 2018).

3.4.3. Respostas dos biomarcadores em ostras *C. gasar* e possíveis correlações entre os níveis de contaminantes

Organismos aquáticos são frequentemente expostos à uma variedade de contaminantes antropogênicos. O processo de metabolização de substâncias xenobióticas ou endógenas consiste em duas etapas catalíticas fundamentais: Fase I: Transformação enzimática e Fase II: Conjugação com moléculas endógenas eletrofílicas (Guengerich, 2008; Jancova et al., 2010). Em condições estressoras, a modulação diferencial na transcrição de determinados genes pode ser considerada uma estratégia evolutiva, conferindo-lhes a habilidade de adaptação, além de minimizar os efeitos tóxicos de poluentes.

O receptor de hidrocarboneto (AhR) é descrito como fator de transcrição em vias de biotransformação (Köhle; Bock, 2007), atuando na modulação transcricional de vias importantes (Zhou et al., 2020), como Citocromo P450 (*CYP450*) e Glutathione S-Transferase (*GST*), em bivalves. No presente estudo avaliamos as alterações nos níveis de transcritos de três isoformas de Citocromo P450 (*CYP356A1-like*, *CYP2AUI-like* e *CYP1-like*), Glutathione S-Transferase Ômega (*GSTO-like*) e Sulfotransferase (*SULT-like*) em brânquias de ostras *C. gasar*, conforme demonstrado na Figura 3.

P450s é uma superfamília de heme-enzimas que apresentam papel central na biotransformação de xenobióticos e endobióticos, sendo descrita como uma das principais vias de detoxificação em diferentes modelos ecotoxicológicos (Sharifian et al., 2020). Este fato está associado tanto à versatilidade catalítica, que abrange reações de oxirredução, hidrólise e epoxidação, quanto à promiscuidade de substratos (Guengerich, 2001, Bernhardt, 2006).

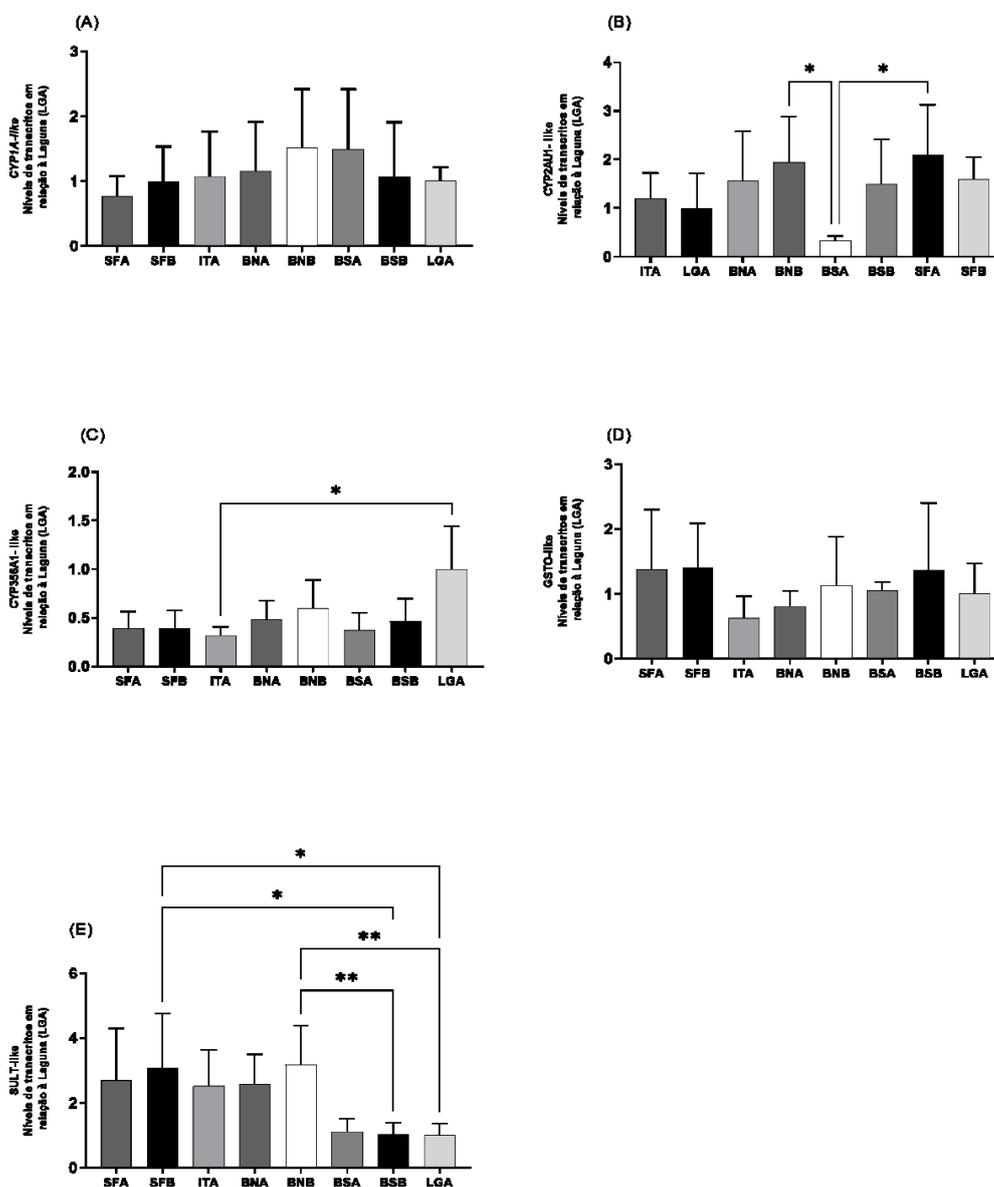
Em vertebrados, as famílias *CYP* 1-3 são altamente induzidas por diversos xenobióticos, como pesticidas, fármacos, HPAs, PCBs e outros (revisado por Lewis et al., 2004). Apesar disso, os mecanismos de regulação de P450s em invertebrados, especialmente em bivalves, ainda não são completamente elucidados. Em nosso estudo não foram observadas alterações significativas nos transcritos de *CYP1-like* entre as ostras coletadas nos diferentes locais (Fig. 3A). Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa relataram que respostas diferenciais nos transcritos de *CYP1-like* em bivalves expostos à diferentes xenobióticos podem ser espécie-específicos e/ou tecidos-específicos (Zacchi et al., 2019; Reis et al., 2020; Bastolla et al., 2023). Em contrapartida, ostras *C. gasar* coletadas em SF-A e BN-B apresentaram

significativa indução nos transcritos de *CYP2AUI-like* em relação à BS-A (6,4-fold e 5,9-fold, respectivamente) (Fig. 3B).

Citocromo P450 2 (*CYP2*) é amplamente reconhecida como a maior e mais diversa subfamília de *CYPs* em vertebrados (Lewis et al., 2004) e invertebrados (Goldstone et al., 2006). Estudos prévios apontaram *CYP2AUI-like* como um biomarcador responsivo em *C. gasar*, principalmente à HPAs (PYR, FLU, PHE, CHR) (Reis et al., 2015; Pessati et al., 2016; Zacchi et al., 2017; 2019; Bastolla et al., 2023). Similarmente, Milan et al (2013) também relataram indução nos transcritos de *CYP2UI-like* em *R. phillipinarum* em resposta a exposição à ibuprofeno. Neste sentido, nossos resultados indicam *CYP2AUI-like* como biomarcador responsivo à diferentes xenobióticos em *C. gasar*.

Neste trabalho observamos uma leve correlação negativa entre os transcritos de *CYP2AUI-like* e os níveis de AINEs ($r^2 = -0,27$, $p < 0,05$) (Fig. 5B) em *C. gasar*. É possível que esse resultado esteja relacionado ao mecanismo de ação dos AINEs, os quais atuam como inibidores não seletivos de ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), resultando na inibição da síntese e liberação de prostaglandinas (PGs), a partir do ácido araquidônico (AA) (Parolini, 2020). Em invertebrados, as PGs possuem papel central na regulação do ciclo reprodutivo e gametogêneses (Costanzo et al., 2019).

Figura 3. Níveis de transcritos dos genes envolvidos nas fases I (*CYP1-like*, *CYP2AUI-like* e *CYP356A1*) e II (*GSTO-like* e *SULT-like*) de biotransformação de xenobióticos em brânquias de ostras *Crassostrea gasar* coletadas em diferentes regiões de Santa Catarina: São Francisco do Sul (SF-A e SF-B), Itajaí (IT-A), Baías Norte (BN-A e BN-B) e Sul (BS-A e BS-B) de Florianópolis e Laguna (LG-A). Os valores estão apresentados na forma de média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre locais estão indicados por asterisco (*).



Além do *CYP2AUI-like*, os níveis de transcrição do *CYP356A1* também variariam entre os locais, com um aumento em ostras *C. gasar* coletadas em LG-A (3,1-fold) em relação à IT-A (Fig. 3C). Adicionalmente, observamos correlações fracas e negativas entre os transcritos de *CYP356A1* e as concentrações de PCBs e AB ($r^2 = -0,31$ e $r^2 = 0,27$, $p < 0,05$, respectivamente) (Fig. 5B). A subfamília *CYP3* é responsável pelo metabolismo de cerca de 40 a 60% dos compostos farmacêuticos em vertebrados (Guengerich, 2008). Alguns estudos indicam um

papel semelhante dessa subfamília em invertebrados, o que está de acordo com a correlação encontrada entre os níveis de transcrição de *CYP356A1* e AB. Além disso, análises filogenéticas conduzidas por Toledo et al (2008) identificaram uma proximidade evolutiva entre *CYP356A1* de *C. gigas* e os membros de *CYP17* e *CYP1*, sugerindo envolvimento desta isoforma no metabolismo de esteróides, além de sua função na biotransformação.

As fontes de compostos desreguladores endócrinos (EDCs) nos ambientes costeiros são diversas, incluindo medicamentos, pesticidas, plásticos, lubrificantes e seus derivados, e outros (Metcalfe et al., 2022). É importante notar que, apesar da co-ocorrência de diversos contaminantes, os animais coletados em LG-A exibiram níveis mais elevados de compostos farmacêuticos, como hormônios (sintéticos e naturais) e AINEs, em comparação àqueles de IT-A (Tabela S-5), o que pode estar associado com o aumento nos níveis de transcritos de *CYP356A1* em ostras de LG-A. Os resultados observados neste trabalho corroboram com estudos anteriores que relatam uma modulação diferencial em bivalves expostos à esgoto sanitário (Flores-Nunes et al., 2015), HPAs (Lüchmann et al., 2014; Zacchi et al., 2019; Bastolla et al., 2022), fármacos (Serrano et al., 2015; Mezzelani et al., 2021) e pesticidas (Ip et al., 2021).

A fase II de biotransformação é vital nos processos de biotransformação e eliminação de xenobióticos, reduzindo sua toxicidade e tornando-os mais solúveis em água, facilitando a excreção. Este processo é mediado principalmente por enzimas transferases, que atuam na conjugação de subprodutos da fase I às moléculas polares endógenas (GSH ou grupo sulfato), além de também realizar inativação metabólica de substâncias farmacologicamente ativas (Jancova et al., 2010).

Além das respostas transcricionais envolvidas na fase I de biotransformação de xenobióticos, as ostras de SF-B, BN-B e BN-A apresentaram uma significativa regulação positiva nos transcritos de *SULT-like* (3-fold, 4,2-fold e 3,5-fold, respectivamente) em relação à BS-B e LG-A (Fig. 3E). Sulfotransferase (SULTs) compreende uma grande classe de enzimas que catalisam a transferência de parte do grupo sulfonato de 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS) para um grupo funcional hidroxila ou amina primária da molécula alvo (Jancova et al., 2010).

Estudos anteriores também relatam uma indução nos transcritos de *SULT* em bivalves expostos à diferentes contaminantes: HPAs (Zacchi et al., 2017; Piazza et al., 2016), efluentes urbanos (Pessatti et al., 2016), biotoxinas (Li et al., 2017) e pesticidas (Guerreiro et al., 2020). Interessantemente, observamos uma fraca correlação positiva ($r^2 = 0,31$, $p < 0,05$) entre os transcritos deste gene e os níveis de bioacumulação de PCBs em *C. gasar* (Fig. 5B), sugerindo um possível envolvimento de *SULT-like* no processo de detoxificação destes POPs.

Em contrapartida, não foram observadas alterações significativas nos níveis de transcritos de *GSTO-like* em ostras *C. gasar* (Fig. 3D). Entretanto, a atividade catalítica GST mostrou expressiva responsividade entre as localidades monitoradas (Fig. 4E). Ostras *C. gasar* coletadas em SF-A, SF-B e BN-B apresentaram atividade GST de 2 a 2,8 vezes maior quando comparadas à LG-A e BS-B. Similarmente, os animais provenientes de São Francisco (SF-A e SF-B) também apresentaram aumento (2,2 a 2,5 vezes) na atividade GST em relação à BN-A e IT-A.

De acordo com Hayes et al (2005), diferenças nas respostas GST, em mamíferos, podem estar associadas à diversidade de classes, isoformas e frações celulares (citossólica, microsossomais e mitocondriais). Embora ainda não seja completamente esclarecido em invertebrados, estudos relatam diferentes fatores preditores que podem influenciar na especificidade das isoformas GSTs, como espécie (Reis et al., 2020; Bastolla et al., 2023), tecido-alvo (Yao et al., 2017; Zhou et al., 2020; Zhou et al., 2022) e sazonalidade (Charouri et al., 2022). Portanto, esses achados podem contribuir para as diferenças observadas em nível molecular e bioquímico neste trabalho.

Por fim, observamos também uma fraca correlação positiva ($r^2 = 0,39$, $p < 0,01$) entre a atividade GST e os níveis de AB nas ostras (Fig. 5B). Em nosso entendimento, esses resultados podem estar relacionados ao modo de ação de determinadas classes de AB, como fluoroquinolonas (ciprofloxacina) e sulfonamidas (sulfametoxazol) (ambos detectados em nosso estudo) (Redgrave et al., 2014). Esses compostos permitem o aumento de EROs, gerando danos oxidativos às biomoléculas (proteínas, lipídios e ácidos nucleicos) e, conseqüentemente, comprometendo a integridade e função celular das células bacterianas (Kohanski et al., 2007).

Muitos outros poluentes antropogênicos, além dos AB, podem desencadear a superprodução de EROs e, potencialmente, levar ao estresse oxidativo (Sies, 2017), resultando em peroxidação lipídica e danos em proteínas e ácidos nucleicos (Zheng et al., 2020). Nossos resultados corroboram com o potencial oxidativo dos poluentes antropogênicos. Ostras *C. gasar* coletadas em SF-B apresentaram atividade SOD 3,5 vezes maior em relação à LG-A (Fig 4A). Da mesma forma, maior atividade SOD também foi observada nos animais de LG-A em relação à BN-A, BN-B e BS-B (2,1 a 4,1 vezes) (Fig. 4A). Além disso, a correlação de Spearman indicou uma relação positiva entre a atividade SOD e a bioacumulação de desreguladores endócrinos ($r^2 = 0,63$, $p < 0,001$), pesticidas ($r^2 = 0,29$, $p < 0,05$) e AINEs ($r^2 = 0,30$, $p < 0,05$) em ostras *C. gasar* (Fig. 5B).

SODs são metaloenzimas que catalisam a dismutação do ânion radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2). Estresse oxidativo é bem descrito

como parte do mecanismo de toxicidade de pesticidas (Abdollahi et al., 2004; Sule et al., 2022), conforme observado em ostras *C. gigas* e mexilhões *M. edulis* expostos à clorotalonil (Haque et al., 2019) e atrazina (Lee et al., 2017). Além disso, nossos resultados corroboram também com estudos prévios com *M. galloprovincialis* expostos à AINEs (ibuprofeno, 250 ng L⁻¹) (revisado por Almeida et al., 2020 a, b) e EE2 (125 ng L⁻¹) (Cunha et al., 2023), onde também foram observados maior atividade SOD em relação aos respectivos grupos controle.

Além das diferenças observadas na atividade SOD, as ostras coletadas em BN-B (Fig. 4B) apresentaram maior atividade CAT (1,5 vezes) em comparação à BN-A, indicando diferença entre ambos locais monitorados na baía norte de Florianópolis. CAT e GPx atuam coordenadamente na mitigação e/ou prevenção de danos oxidativos gerados pelo H₂O₂, produzido pela SOD e outras potenciais fontes, catalisando sua degradação em H₂O e O₂ (Valavanidis et al., 2006). Esse resultado pode estar associado ao perfil de bioacumulação de contaminantes das ostras coletadas em BN-B, os quais detectamos apenas HPAs. De fato, as correlações negativas entre CAT e os níveis de AB ($r^2 = -0,31$, $p < 0,05$) e AINEs ($r^2 = -0,46$, $p < 0,001$) foram observadas neste estudo. No entanto, ressaltamos que a atividade CAT foi semelhante entre todos os locais de amostragem, o que pode sugerir a influência de outros fatores.

Referente à atividade GPx, ostras *C. gasar* provenientes de IT-A e BS-A apresentaram atividade GPx de 1,6 a 1,7 vezes maior em relação à LG-A. Interessantemente, Ferreira et al (2021) também observaram menor atividade GPx em brânquias de *C. gasar* transplantadas no Completo Estuarino de Laguna (LES) após 1,5 dias de exposição, em comparação ao início do experimento. Esse resultado evidencia uma redução na proteção antioxidante, mediado pelo aumento de EROs associado à poluição por metais em Laguna.

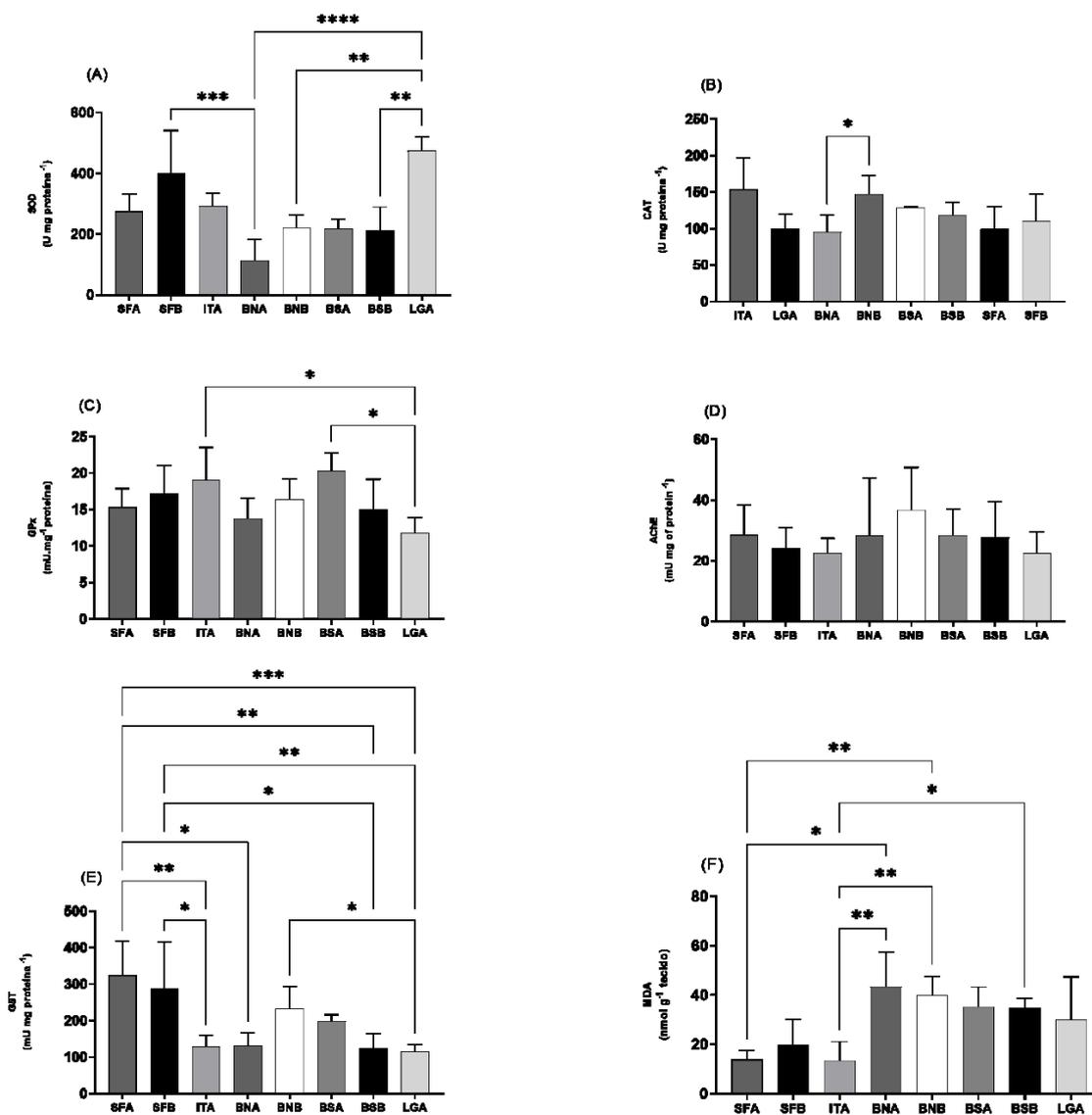
Os lipídios, componente estrutural das membranas celulares, são considerados alvo de danos oxidativos resultantes da superprodução de EROs. A determinação dos níveis de produtos secundários à peroxidação lipídica, como o MDA, é amplamente utilizada como marcador de lesão associada ao estresse oxidativo em moluscos bivalves (Valavanidis et al., 2006). Em nosso trabalho observamos níveis de peroxidação lipídica de 2,6 a 3,2 vezes maiores em ostras *C. gasar* coletadas nas Baías norte (BN-A e BN-B) e sul (BS-B) de Florianópolis em relação à IT-A e SF-A (Fig. 4F).

Embora as ostras *C. gasar* coletadas em BN-B tenham apresentado uma indução, tanto em nível molecular como enzimático, dos sistemas de biotransformação (CYP2A1-like, SULT-like e GST) e defesa antioxidante (CAT), nossos resultados sugerem que essa resposta foi insuficiente para minimizar os danos oxidativos resultantes da exposição a contaminantes

antropogênicos, potencialmente HPAs, uma vez que essa classe de contaminantes só foi detectada em ostras desse local.

Interessantemente, em contraste aos estudos prévios na literatura, os níveis de MDA foram negativamente correlacionados à bioacumulação de pesticidas ($r^2 = -0,47$, $p < 0,001$), PCBs ($r^2 = -0,48$, $p < 0,001$), ED ($r^2 = -0,42$, $p < 0,001$) e AB ($r^2 = -0,33$, $p < 0,05$) neste estudo. Portanto, hipotetizamos que outras variáveis abióticas possam também contribuir para o estabelecimento de condições pró-oxidantes, semelhantes à poluentes antropogênicos, e, portanto, promovam danos oxidativos nas ostras residentes de BN-A e BS-B. Por fim, não foram observadas diferenças significativas na atividade AChE (Fig. 4D) e imunodeteção de HSP70 (Fig. 4G) em brânquias de *C. gasar* neste estudo.

Figura 4. Atividade das enzimas envolvidas na defesa antioxidante (SOD, CAT, GPx), biotransformação de xenobióticos (GST), transmissão de impulso nervoso (AChE) e de dano oxidativo (MDA) em ostras *C. gasar* coletadas em diferentes regiões de Santa Catarina: São Francisco do Sul (SF-A e SF-B), Itajaí (IT-A), Baías Norte (BN-A e BN-B) e Sul (BS-A e BS-B) de Florianópolis e Laguna (LG-A). Os dados estão apresentados na forma de média \pm desvio-padrão. Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre locais estão indicados por asteriscos (*).



3.4.6. Influência dos fatores ambientais na resposta dos biomarcadores

A avaliação da poluição em ambientes costeiros e estuarinos é considerada um desafio no âmbito ecotoxicológico, devido ao aporte de misturas complexas de xenobióticos e o dinamismo envolvendo as variáveis ambientais. Além dos contaminantes antropogênicos, fatores abióticos como salinidade, pH, temperatura e oxigênio dissolvido também podem influenciar o estado de saúde oxidativa dos organismos aquáticos (Monserrat et al., 2007). Os dados dos parâmetros ambientais são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de qualidade de água coletados nos locais de monitoramento na região costeira de Santa Catarina: São Francisco do Sul (SF-A e SF-B), Itajaí (IT-A), Florianópolis: Baía Norte (BN-A e BN-B), Baía Sul (BS-A e BS-B) e Laguna (LG-A). A sigla *nd* representa *não determinado*.

Parâmetros	Unidade	Locais monitorados							
		SF-A	SF-B	IT-A	BN-A	BN-B	BS-A	BS-B	LG-A
pH		8,0	7,5	6,6	7,0	6,2	6,7	6,1	6,2
Salinidade	‰	22,3	21,2	12,0	27,6	20,1	33,5	23,0	16,5
Condutividade	mS cm ⁻¹	35,5	34,1	<i>nd</i>	41,7	31,3	48,6	33,5	<i>nd</i>
Oxigênio dissolvido	mg L ⁻¹	6,1	4,6	4,6	<i>nd</i>	<i>nd</i>	6,3	6,0	8,3
Temperatura da água	°C	23,5	23,0	25,9	28,1	26,6	26,2	27,3	23,2
Temperatura do ar	°C	19,6	19,8	26,0	32,0	29,0	32,6	33,7	22,0

Ostras *C. gasar* possuem mecanismos de tolerância bem desenvolvidos para enfrentar as frequentes oscilações dos fatores abióticos em ambientes estuarinos e entremarés. Entretanto, a variabilidade nas respostas dos biomarcadores em populações naturais pode indicar aclimação às condições ambientais locais (resposta de curto prazo) e/ou adaptação genética (resposta de longo prazo) (Grbin et al., 2019). Baseado nisso, a correlação de Spearman foi realizada para investigar as possíveis associações entre os parâmetros ambientais (Tabela S-3) e as respostas dos biomarcadores em *C. gasar* (Fig. 5A).

As flutuações de salinidade decorrentes das alterações na maré, precipitação e escoamento de águas continentais impõem uma situação de estresse osmótico aos bivalves residentes em regiões costeiras. Neste contexto, numerosos estudos relatam que condições hipo e hiper osmóticas influenciam no equilíbrio redox celular e na respiração mitocondrial em invertebrados. Neste estudo observamos uma fraca a moderada correlação negativa entre salinidade, CAT ($r^2 = -0,28$, $p < 0,05$) e SOD ($r^2 = -0,50$, $p < 0,001$). Por outro lado, a atividade GST ($r^2 = 0,30$, $p < 0,05$) e os níveis de MDA foram positivamente associados a este parâmetro ($r^2 = 0,28$, $p < 0,05$).

Esses resultados podem indicar diferentes estratégias fisiológicas adotadas por *C. gasar* em resposta ao estresse salino. Em condições hiposmóticas, a ativação do sistema de defesa antioxidante em organismos osmoconformadores, como os bivalves, é bem descrita como uma resposta ao aumento de EROs (revisado por Bal et al., 2021). Portanto, é possível que as baixas salinidades observadas em BN-B e LG-A, em relação às demais localidades, também contribuam para a indução de SOD observada em *C. gasar*.

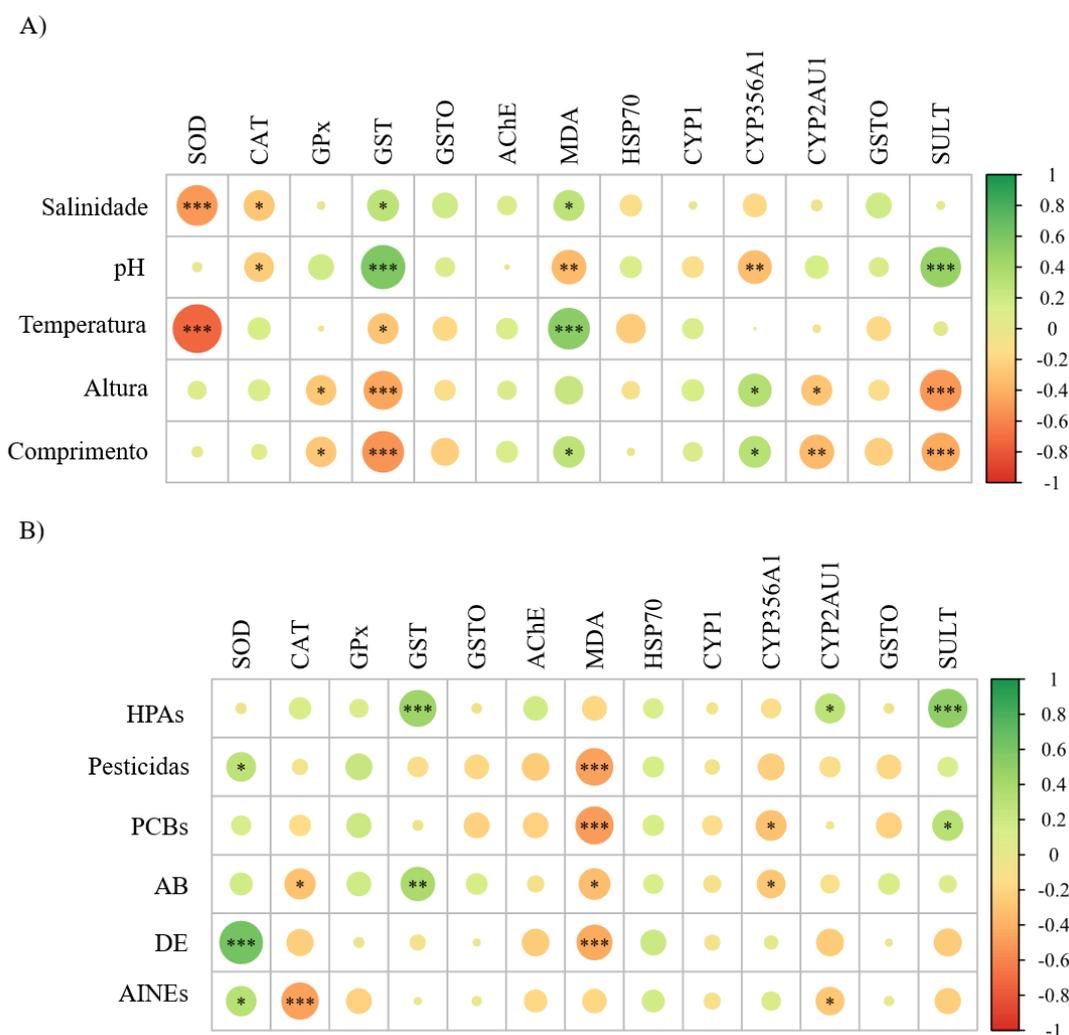
Além disso, moluscos bivalves têm a capacidade de regular o volume celular, recorrendo à mobilização de aminoácidos livres intracelulares, como uma estratégia de osmorregulação de maior custo energético. Em condições hiposmóticas, esse processo envolve o aumento na taxa metabólica dos tecidos, resultando na liberação de compostos nitrogenados, como amônia e aminoácidos. Posteriormente, esses compostos são catabolizados pelas brânquias e manto dos bivalves e, então, são excretados (revisado por Pourmozaffar et al., 2019). Portanto, é possível que as GSTs desempenhem um papel tanto na osmorregulação como na detoxificação de compostos endógenos nas ostras de SF-A, SF-B e BN-B. Entretanto, investigações adicionais são necessárias para confirmar essa hipótese.

O estresse térmico é um dos fatores abióticos mais dramáticos em ambientes estuarinos e intertidais, com potencial para induzir ao estresse oxidativo em organismos aquáticos (Lushchak et al., 2011). Em nosso estudo observamos uma correlação negativa entre a temperatura da água e as atividades SOD ($r^2 = -0,73$, $p < 0,001$) e GST ($r^2 = -0,28$, $p < 0,05$). Em contrapartida, houve uma moderada associação positiva entre os níveis de peroxidação lipídica em *C. gasar* ($r^2 = 0,53$, $p < 0,001$) e este parâmetro.

Em temperaturas mais baixas, ocorre uma diminuição na capacidade metabólica em sistemas biológicos, o que pode resultar em alterações na produção de EROs na cadeia respiratória mitocondrial, além de afetar a defesa antioxidante (Zhang et al., 2016). Resultados similares foram observados por Lima et al (2018), onde ostras *C. gasar* apresentaram uma ligeira indução nos níveis de transcritos de *SOD-like* em temperaturas mais baixas (18 °C e 24°C) quando comparados à maior temperatura (32°C). Portanto, hipotetizamos que esse mecanismo de termotolerância esteja envolvido, em parte, na indução do sistema antioxidante observada nos animais de LG-A e SF-A (23, 2 a 23,5°, respectivamente).

Em contrapartida, a exposição às temperaturas mais elevadas impulsiona todos os processos metabólicos, aumentando a produção de EROs como subproduto do metabolismo oxidativo e causando danos oxidativos, como a peroxidação lipídica das membranas biológicas (Zhang et al., 2016). Conforme nossos resultados, Lima et al (2018) também observaram uma regulação negativa na fase II de biotransformação (em nível molecular e bioquímico) nas ostras *C. gasar* expostas às temperaturas mais altas (24°C e 32°C). Esses resultados evidenciam os efeitos do estresse térmico sob os sistemas de biotransformação e defesa antioxidante em *C. gasar* e alertam para os futuros cenários climáticos.

Figura 5. (A) Matriz de correlação de Spearman entre os biomarcadores, variáveis ambientais (salinidade, pH e temperatura) e dados biométricos das ostras *C. gasar* coletadas nos diferentes locais da região costeira de Santa Catarina monitorados. (B) Matriz de correlação de Spearman entre os contaminantes e os biomarcadores avaliados em brânquias de ostras *C. gasar* coletadas nos diferentes locais da região costeira de Santa Catarina monitorados. Correlações positivas são exibidas em verde e correlações negativas em vermelho. A intensidade da cor e o tamanho do círculo são proporcionais aos coeficientes de correlação. Significância indicada por $*=p < 0,05$, $**=p < 0,01$ e $***=p < 0,001$.



Além das flutuações de temperatura, os organismos residentes em ecossistemas costeiro-marinhos desenvolveram mecanismos fisiológicos para minimizar os efeitos das flutuações de pH no metabolismo energético, homeostase ácido-base e estado oxidativo dos animais (Tomanek et al., 2011). Por exemplo, ostras *C. gasar*, em situações de hipercapnia, podem parcialmente compensar a acidose através de alterações metabólicas, incluindo a depressão metabólica, o que evita a superprodução de EROs, ao mesmo tempo em que mantém o equilíbrio energético (Moreira et al., 2018). Neste contexto, a diminuição das respostas relacionadas ao sistema de defesa antioxidante é considerada uma resposta esperada, conforme

demonstrado por Lima et al. (2019). Entretanto, neste estudo observamos que a atividade CAT foi negativamente correlacionada ao pH da água ($r^2 = -0,26$, $p < 0,05$) (Fig. 5A), sugerindo que níveis mais baixos de pH podem ser parcialmente responsáveis pelas diferenças na indução de atividade de defesas antioxidantes observadas em *C. gasar* coletadas em BN-B (pH = 6,23) e BN-A (pH = 7,00).

Além disso, no contexto das mudanças climáticas, a acidificação dos ambientes tem sido debatida por grupos de pesquisa em todo o mundo, devido seu impacto na biodisponibilidade de poluentes antropogênicos, na bioacumulação e na capacidade de resposta biológica em organismos aquáticos (Bethke et al., 2023). A problemática é mais evidente quando se trata de contaminantes emergentes, visto que aproximadamente 80% dos compostos farmacêuticos são susceptíveis a ionização (Manallack et al., 2008).

Em nosso estudo observamos uma relação inversa entre os transcritos do gene *CYP356A1-like* das ostras e o pH da água ($r^2 = -0,34$, $p < 0,05$). Estudos anteriores que demonstram um aumento da toxicidade de diferentes compostos farmacêuticos a medida em que o pH da água é reduzido, afetando a biotransformação dessas substâncias em invertebrados marinhos (Serra-Compte et al., 2018; Almeida et al., 2018; Munari et al., 2018; Dionísio et al., 2020).

Em nosso estudo, observamos maior bioacumulação de compostos farmacêuticos em BS-A e LG-A, respectivamente, em relação a IT-A. No entanto, identificamos alterações nos níveis de transcrição de *CYP356A1-like* apenas nas ostras de LG-A. Portanto, nossa hipótese é que o pH mais baixo observado em LG-A pode estar associado a mudanças na toxicidade das substâncias, desencadeando a ativação da fase I de biotransformação como resposta à exposição. Esses resultados também evidenciam o envolvimento de *CYP356A1-like* no metabolismo de drogas e sugerem o potencial uso desse biomarcador como responsivo a fármacos em estudos de biomonitoramento.

Quanto à fase II de biotransformação, a atividade GST e os transcritos de *SULT-like* foram positivamente correlacionadas ao pH da água neste estudo ($r^2 = 0,50$ e $r^2 = 0,59$, $p < 0,001$, respectivamente). Lima et al (2019) também observaram um aumento na atividade GST em ostras *C. gasar* aclimatadas ao pH 8,2 e, posteriormente, expostas a fenantreno durante 24h. GSH é o principal tiól de baixo peso molecular nas células e possuem papel central na modulação do estado redox celular (Dickinson; Forman, 2002). Por outro lado, a sulfatação desempenha papel fundamental tanto no metabolismo de xenobióticos como de endobióticos (Strott, 2002). Esses resultados podem indicar que a ativação da fase II de biotransformação em resposta a múltiplos estressores, incluindo as variações de pH, provavelmente ocorre devido

sua eficiência energética em relação aos sistemas antioxidantes, conforme demonstrado em SF-A, SF-B e BN-B.

3.4 Conclusão

Os resultados obtidos em nosso estudo demonstraram a presença de CEs e POPs em diferentes regiões de Santa Catarina. Concentrações mais elevadas de compostos farmacêuticos foram detectadas na região centro-sul do estado, enquanto que os níveis de PCBs, HPAs e PEST foram mais prevalentes na região norte. A regulação positiva nos níveis de transcritos da fase I (*CYP2AUI-like*, *CYP356A1-like*) e II (*SULT-like*) sugerem a ativação das vias de biotransformação em ostras *C. gasar* de São Francisco do Sul, Florianópolis (BN-B) e Laguna em resposta aos contaminantes. As ostras também demonstraram um aumento nas defesas antioxidantes (SOD, CAT, GPx) e biotransformação (GST) em diferentes localidades. Entretanto, os níveis de peroxidação lipídica demonstram maior susceptibilidade ao estresse oxidativo nos animais coletados na região metropolitana de Florianópolis (BN-A, BN-B e BS-B). Essas variações nos refletem adaptações iniciais às condições pró-oxidantes causadas por atividades humanas, bem como estressores ambientais (salinidade, temperatura, pH). Estes resultados reforçam a necessidade de melhorias no saneamento em Santa Catarina, além de destacar seus impactos na vida aquática.

3.5 Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (bolsa de estudo nº 88887.461557/2019-00 para C.L.V.B) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC, Processo nº 2020TR734). Os autores agradecem imensamente ao Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM/UFSC), em especial ao Dr. Carlos. H. A. M. Gomes, pelo auxílio nas coletas de campo e identificação das espécies de ostras. A.C.D. Bainy, E.A. Almeida e C.M.R. Melo são beneficiários da bolsa de produtividade do CNPq. As coletas realizadas em unidades de conservação ambiental (BN-A) foram previamente autorizadas através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO nº 78255/1).

3.6 Referências bibliográficas

Adeel, M. et al. 2017. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: a critical review. **Environment International**, v. 99, p. 107-119.

- Ademollo, N. et al. 2021. Occurrence, distribution and pollution pattern of legacy and emerging organic pollutants in surface water of the Kongsfjorden (Svalbard, Norway): environmental contamination, seasonal trend and climate change. **Marine Pollution Bulletin**, v. 163, p. 111900.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, p.121-126.
- Albuquerque, A. F.; et al. 2016. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 18, n. 7, p. 779-787.
- Ali, S. H; Oliveira, J. A. P. Pollution and economic development: an empirical research review. **Environmental Research Letters**, v. 13, n. 12, p. 123003, 2018.
- Almeida, E. A. et al. 2007. 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.
- Almeida, A. et al. 2018. Effects of carbamazepine and cetirizine under an ocean acidification scenario on the biochemical and transcriptome responses of the clam *Ruditapes philippinarum*. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 857-868.
- Almeida, A. et al. 2020a. Concentrations levels and effects of 17alpha-Ethinylestradiol in freshwater and marine waters and bivalves: a review. **Environmental Research**, v. 185, p. 109316.
- Almeida, A. et al. 2020b. Anti-inflammatory drugs in the marine environment: bioconcentration, metabolism and sub-lethal effects in marine bivalves. **Environmental Pollution**, v. 263, p. 114442.
- Álvarez-Muñoz, D. et al. 2015a. Multi-residue method for the analysis of pharmaceuticals and some of their metabolites in bivalves. **Talanta**, v. 136, p. 174-182.
- Álvarez-Muñoz, D. et al. 2015b. Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in macroalgae, bivalves, and fish from coastal areas in Europe. **Environmental Research**, v. 143, p. 56-64.
- Anadón, A. et al. 2009. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v. 182, n. 1, p. 7-20.
- Anyahara, J. 2021. Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) on the Environment: a systematic review. **International Journal of Advanced Academic Research**, p. 12-26.
- Arp, H. P. H. et al. 2023. Avoiding the Next Silent Spring: our chemical past, present, and future. **Environmental Science & Technology**, v. 57, n. 16, p. 6355-6359.
- ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2007. Department of Health and Human Service. Heptachlor and Heptachlor Epoxide.

Bai, X.; Acharya, K. 2018. Uptake of endocrine-disrupting chemicals by quagga mussels (*Dreissena bugensis*) in an urban-impacted aquatic ecosystem. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 1, p. 250-258.

Bal, A. et al. 2021. Modulation of physiological oxidative stress and antioxidant status by abiotic factors especially salinity in aquatic organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 241, p. 108971.

Balbi, T. et al. 2019. Estrogenic compounds as exogenous modulators of physiological functions in molluscs: signaling pathways and biological responses. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 222, p. 135-144.

Baralla, E. 2021. Bisphenols' occurrence in bivalves as sentinel of environmental contamination. **Science Of The Total Environment**, v. 785, p. 147263.

Bashnin, T. et al. 2019. Relationship between pesticide accumulation in transplanted zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and community structure of aquatic macroinvertebrates. **Environmental Pollution**, v. 252, p. 591-598.

Bastolla, C. L.V. et al. 2022. Molecular changes in oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) from aquaculture areas of Santa Catarina Island bays (Florianópolis, Brazil) reveal anthropogenic effects. **Chemosphere**, v. 307, p. 135735.

Bastolla, C.L.V. et al. 2023. Comparative biochemical and molecular responses of biotransformation and antioxidant systems in three species of *Crassostrea* (Sacco, 1897) oysters exposed to chrysene. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 270, p. 109642.

Bernhardt, R. 2006. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. **Journal Of Biotechnology**, v. 124, n. 1, p. 128-145.

Bethke, K. et al. 2023. Review of warming and acidification effects to the ecotoxicity of pharmaceuticals on aquatic organisms in the era of climate change. **Science Of The Total Environment**, v. 877, p. 162829.

Bilal, M. et al. 2020. Antibiotics traces in the aquatic environment: persistence and adverse environmental impact. **Current Opinion In Environmental Science & Health**, v. 13, p. 68-74.

Bosch-Orea, C. et al. 2023. Integrated analysis of marine biotoxins and contaminants of emerging concern in bivalve mollusks from Santa Catarina, Brazil. **Science Of The Total Environment**, v. 905, p. 167254.

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

Brazil, 1985. Brazil Ministry of Agriculture Directive 329 from September 2, 1985. Diário Oficial da União, Brasília, DF (1985), p. 12941, 3 sep., Section 1

Briand, M. J. et al. 2023. The French Mussel Watch: more than two decades of chemical contamination survey in mediterranean coastal waters. **Marine Pollution Bulletin**, v. 191, p. 114901.

Burket, S. et al. 2019. *Corbicula fluminea* rapidly accumulate pharmaceuticals from an effluent dependent urban stream. **Chemosphere**, v. 224, p. 873-883.

Carvalho, I. T.; Santos, L. 2016. Antibiotics in the aquatic environments: a review of the european scenario. **Environment International**, v. 94, p. 736-757.

Carvalho, M. M. X. et al. 2017. “Defensives” ou “pesticides”? A history of the use and perception of pesticides in the state of Santa Catarina, Brazil, 1950-2002. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 24, n. 1, p. 75-91.

Castaño-Ortiz, J.M. et al. 2023. Bioaccumulation and fate of pharmaceuticals in a Mediterranean coastal lagoon: temporal variation and impact of a flash flood event. **Environmental Research**, v. 228, p. 115887.

Chahouri, A. et al. 2022. Assessment of seasonal and spatial variation responses of integrated biomarkers in two marine sentinel bivalve species: Agadir Bay (Southern of Morocco). **Marine Pollution Bulletin**, v. 174, p. 113179.

Chen, H. et al. 2015. Antibiotics in typical marine aquaculture farms surrounding Hailing Island, South China: occurrence, bioaccumulation and human dietary exposure. **Marine Pollution Bulletin**, v. 90, n. 1-2, p. 181-187.

Chiu, J. M.T. et al. 2018. Contamination and risk implications of endocrine disrupting chemicals along the coastline of China: a systematic study using mussels and semipermeable membrane devices. **Science Of The Total Environment**, v. 624, p. 1298-1307.

Coello-Garcia, T. et al. 2019. Enhanced estrogen removal in activated sludge processes through the optimization of the hydraulic flow pattern. **Water Research**, v. 164, p. 114905.

Costanzo, F. et al. 2019. Prostaglandins in Marine Organisms: a review. **Marine Drugs**, v. 17, n. 7, p. 428.

Decisão de Execução (UE) 2018/840 da Comissão [Documento WWW], 2018. Decisão de Execução (UE) 2015/495, de 5 de junho de 2018, que estabelece uma lista de vigilância de substâncias para monitorização à escala da União no domínio da política da água nos termos da Diretiva 2008/ 105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho e revoga a Comissão. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32018D0840&from=EN>. Acesso em: 09.08.2023).

Dickinson, D. A.; Forman, H. J. 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n. 5-6, p. 1019-1026.

Estep A. S. et al. 2018. Quantification of permethrin resistance and kdr alleles in Florida strains of *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse). **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 10, p. 6544-6544.

- Farrington, J. W. 2016. Edward D. Goldberg's proposal of “the Mussel Watch”: reflections after 40 years. **Marine Pollution Bulletin**, v. 110, n. 1, p. 501-510.
- Fernando, H. et al. 2019. Distribution of petrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in seafood following Deepwater Horizon oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, v. 145, p. 200-207.
- Ferreira et al. 2020. Short-term spatiotemporal biomarker changes in oysters transplanted to an anthropized estuary in Southern Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 709, p. 136042
- Ferreira et al. 2021. Integrated biomarker responses in oysters *Crassostrea gasar* as an approach for assessing aquatic pollution of a Brazilian estuary. **Marine Environmental Research**, v. 165, p. 105252
- Fodor, I. et al. 2020. A critical evaluation of some of the recent so-called ‘evidence’ for the involvement of vertebrate-type sex steroids in the reproduction of mollusks. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 516, p. 110949.
- Frena, M. et al. 2016. Assessment of anthropogenic contamination with sterol markers in surface sediments of a tropical estuary (Itajaí-Açu, Brazil). **Science Of The Total Environment**, v. 544, p. 432-438.
- Gan, N. et al. 2021. Impact of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Accumulation on Oyster Health. **Frontiers In Physiology**, v. 12, p. 734463.
- Gao, J. et al. 2008. Occurrence and distribution of organochlorine pesticides – lindane, p,p'-DDT, and heptachlor epoxide – in surface water of China. **Environment International**, v. 34, n. 8, p. 1097-1103.
- García-Pimentel, M. et al. 2023. Occurrence and distribution of contaminants of legacy and emerging concern in surface waters of two Western Mediterranean coastal areas: Mar menor lagoon and Ebro delta. **Marine Pollution Bulletin**, v. 187, p. 114542.
- Goldstone, J.V. 2006. The chemical defensible: environmental sensing and response genes in the *Strongylocentrotus purpuratus* genome. **Developmental Biology**, v. 300, n. 1, p. 366-384.
- Gong, J. et al. 2023. Suspended particulate matter-associated environmental corticosteroids in the Pearl River, China: occurrence, distribution, and partitioning. **Science Of The Total Environment**, v. 884, p. 163701.
- Granek, E. F. et al. 2016. Spatial and temporal variability of contaminants within estuarine sediments and native Olympia oysters: a contrast between a developed and an undeveloped estuary. **Science Of The Total Environment**, v. 557-558, p. 869-879.
- Grbin, D. et al. 2019. Biomarker response of Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis* regarding environmental conditions, pollution impact and seasonal effects. **Science Of The Total Environment**, v. 694, p. 133470.

- Guengerich, F. P. 2001. Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. **Chemical Research In Toxicology**, v. 14, n. 6, p. 611-650.
- Guengerich, F. P. 2008. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. **Chemical Research In Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 70-83.
- Guercia, C. et al. 2017. Analysis of testosterone fatty acid esters in the digestive gland of mussels by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. **Steroids**, v. 123, p. 67-72.
- Guerreiro, A. S. et al. 2020. First evidence of transcriptional modulation by chlorothalonil in mussels *Perna perna*. **Chemosphere**, v. 255, p. 126947.
- Habibullah-Al-Mamun et al. 2019. Polychlorinated biphenyls (PCBs) in commonly consumed seafood from the coastal area of Bangladesh: occurrence, distribution, and human health implications. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 2, p. 1355-1369.
- Haque, Md. et al. 2019. Chlorothalonil induces oxidative stress and reduces enzymatic activities of Na⁺/K⁺-ATPase and acetylcholinesterase in gill tissues of marine bivalves. **Plos One**, v. 14, n. 4, p. e0214236.
- Hayes, J.D. et al. 2005. Glutathione Transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 51-88.
- He, K. et al. 2019. Occurrence of antibiotics, estrogenic hormones, and UV-filters in water, sediment, and oyster tissue from the Chesapeake Bay. **Science Of The Total Environment**, v. 650, p. 3101-3109.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2017**. Rio de Janeiro. 2017. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sc/sao-francisco-do-sul/pesquisa/24/76693?localidade1=42> Acesso em: 12/09/23
- Ip, J. C. et al. 2021. Transcriptomics reveal triphenyltin-induced molecular toxicity in the marine mussel *Perna viridis*. **Science Of The Total Environment**, v. 790, p. 148040.
- Jancova, P. et al. 2010. Phase II drug metabolizing enzymes. **Biomedical Papers**, v. 154, n. 2, p. 103-116.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183-6188.
- Ketterer, B. et al. 1983. The role of glutathione in detoxication. **Environmental Health Perspectives**, v. 49, p. 59-69.
- Khanal, S. K. et al. 2006. Fate, Transport, and Biodegradation of Natural Estrogens in the Environment and Engineered Systems. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 21, p. 6537-6546.

- King, M. D. et al. 2023. Polycyclic aromatic compound and trace metal element residues in *Mytilus* mussels at marine wildlife hotspots on the Pacific coast of Canada. **Environmental Pollution**, v. 316, p. 120624.
- Köhle, C.; Bock, K. W. 2007. Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, n. 12, p. 1853-1862.
- Kohanski, M. A. et al. 2007. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 797-810.
- Kroeker, K. J. et al. 2010. Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. **Ecology Letters**, v. 13, n. 11, p. 1419-1434.
- Kümmerer, K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 417-434.
- Lee, D. et al. 2017. Sublethal concentrations of atrazine promote molecular and biochemical changes in the digestive gland of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Toxicology And Environmental Health Sciences**, v. 9, n. 1, p. 50-58.
- Lewis, D. et al. 2004. Substrates of Human Cytochromes P450 from Families CYP1 and CYP2: analysis of enzyme selectivity and metabolism. **Drug Metabolism and Drug Interactions**, v. 20, n. 3, p. 1.
- Li, W.; et al. 2012. Investigation of antibiotics in mollusks from coastal waters in the Bohai Sea of China. **Environmental Pollution**, v. 162, p. 56-62.
- Li, Y. et al. 2017. Scallop genome reveals molecular adaptations to semi-sessile life and neurotoxins. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1.
- Li, Z. et al. 2020. A verification of correlation between chemical monitoring and multi-biomarker approach using clam *Ruditapes philippinarum* and scallop *Chlamys farreri* to assess the impact of pollution in Shandong coastal area of China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 155, p. 111155.
- Lima, D. et al. 2018. Molecular and cellular effects of temperature in oysters *Crassostrea brasiliensis* exposed to phenanthrene. **Chemosphere**, v. 209, pp. 307-318
- Lima, J.A.M. C. et al. 2020. “Modern agriculture” transfers many pesticides to watercourses: a case study of a representative rural catchment of southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 10581–10598.
- Lin, X. et al. 2023. Occurrence and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in marine organisms from Shenzhen coastal waters and human health risk assessment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 195, p. 115498.
- Lushchak, V. I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13-30.

Marques, F. B. et al. 2020. Overview of Brazilian aquaculture production. **Aquaculture Research**, v. 51, n. 12, p. 4838-4845.

Masiá, A. et al. 2015. Pesticide monitoring in the basin of Llobregat River (Catalonia, Spain) and comparison with historical data. **Science Of The Total Environment**, v. 503-504, p. 58-68.

McCord, J. M.; Fridovich, I. 1969. Superoxide Dismutase. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055.

Mello, F. V.; et al. 2022. Occurrence of pharmaceuticals in seafood from two Brazilian coastal areas: implication for human risk assessment. **Science Of The Total Environment**, v. 803, p. 149744.

Melwani, A. R. et al. 2014. Mussel watch update: long-term trends in selected contaminants from coastal California, 1977-2010. **Marine Pollution Bulletin**, v. 81, n. 2, p. 291-302.

Metcalf, C.D. et al. 2022. An introduction to the sources, fate, occurrence and effects of endocrine disrupting chemicals released into the environment. **Environmental Research**, v. 207, p. 112658.

Mezzelani, M. et al. 2016. Ecotoxicological potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in marine organisms: bioavailability, biomarkers and natural occurrence in *Mytilus galloprovincialis*. **Marine Environmental Research**, v. 121, p. 31-39.

Mezzelani, M. et al. 2020. Human pharmaceuticals in marine mussels: evidence of sneaky environmental hazard along Italian coasts. **Marine Environmental Research**, v. 162, p. 105137.

Milan, M. et al. 2013. Gene transcription and biomarker responses in the clam *Ruditapes philippinarum* after exposure to ibuprofen. **Aquatic Toxicology**, v. 126, p. 17-29.

Moallemi, A. et al. 2019. Local Agenda 2030 for sustainable development. **The Lancet Planetary Health**, v. 3, n. 6, p. 240-241.

Mompelat, S. et al. 2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. **Environment International**, v. 35, n. 5, p. 803-814.

Monserrat, J. M. et al. 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1-2, p. 221-234.

Morgado, M. G. A. et al. 2023. Large-Scale Agriculture and Environmental Pollution of Ground and Surface Water and Sediment by Pesticides in the Brazilian Amazon: the case of the Santarém Region. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 234, n. 3.

Munari, M. et al. 2018. Does exposure to reduced pH and diclofenac induce oxidative stress in marine bivalves? A comparative study with the mussel *Mytilus galloprovincialis* and the clam *Ruditapes philippinarum*. **Environmental Pollution**, v. 240, p. 925-937.

Na, G. et al. 2013. Occurrence, distribution, and bioaccumulation of antibiotics in coastal environment of Dalian, China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 69, n. 1-2, p. 233-237.

Offor, S. J. et al. 2022. Potential deleterious effects of paracetamol dose regime used in Nigeria versus that of the United States of America. **Toxicology Reports**, v. 9, p. 1035-1044.

Oliva, A. L. et al. 2022. Occurrence, behavior and the associated health risk of organochlorine pesticides in sediments and fish from Bahía Blanca Estuary, Argentina. **Marine Pollution Bulletin**, v. 185, p. 114247.

Oost, R. V. D.; Beyer, J.; Vermeulen, N. P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p.57-149.

Organização das Nações Unidas (ONU), Departamento de Assuntos Econômicos e Sociais, **Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development**. Working Paper No. A/RES/70/1. Disponível em:

<https://sustainabledevelopment.un.org/post2015/transformingourworld>

Parolini, M. 2020. Adverse Effects Induced by Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs on Freshwater Invertebrates. **The Handbook of Environmental Chemistry**, p. 147-160.

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

Pessatti, T. B. et al. 2016. Upregulation of biotransformation genes in gills of oyster *Crassostrea brasiliiana* exposed in situ to urban effluents, Florianópolis Bay, Southern Brazil. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 131, p. 172-180.

Petrarca, M.H. et al. 2022. Multi-analyte gas chromatography-mass spectrometry method to monitor bisphenols, musk fragrances, ultraviolet filters, and pesticide residues in seafood. **Journal Of Chromatography A**, v. 1663, p. 462755.

Pisetta, A.M. et al. 2022. First report on the occurrence of pharmaceuticals and cocaine in the coastal waters of Santa Catarina, Brazil, and its related ecological risk assessment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 42, p. 63099-63111.

Pojana, G. et al. 2007. Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. **Environment International**, v. 33, n. 7, p. 929-936.

Pesticides Properties DataBase (PPDB). 2014. University of Hertfordshire. Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>. Acesso em 11/09/23.

Pourmozaffar, S. et al. 2019. The role of salinity in physiological responses of bivalves. **Reviews In Aquaculture**, v. 12, n. 3, p. 1548-1566.

Pratush, A. et al. 2020. Biotransformation strategies for steroid estrogen and androgen pollution. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 6, p. 2385-2409.

Rabalais, N. et al. 2014. Eutrophication-Driven Deoxygenation in the Coastal Ocean. **Oceanography**, v. 27, n. 1, p. 172-183.

Rios, J. H. L. et al. 2016. Long-Term (2002–2015) Changes in Mercury Contamination in NE Brazil Depicted by the Mangrove Oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828). **Bulletin Of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 97, n. 4, p. 474-479.

Redgrave, L. S.; et al. 2014. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. **Trends In Microbiology**, v. 22, n. 8, p. 438-445.

Reis, I. M.M. et al. 2015. Histological responses and localization of the cytochrome P450 (CYP2AU1) in *Crassostrea brasiliiana* exposed to phenanthrene. **Aquatic Toxicology**, v. 169, p. 79-89.

Reis, E. O. et al. 2019. Occurrence, removal and seasonal variation of pharmaceuticals in Brazilian drinking water treatment plants. **Environmental Pollution**, v. 250, p. 773-781.

Reis, I. M. M et al. 2020. Differential responses in the biotransformation systems of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1789) elicited by pyrene and fluorene: molecular, biochemical and histological approach - part ii. **Aquatic Toxicology** v. 226, p. 105565.

Rhinn et al, 2008. One-step quantification of single-stranded DNA in the presence of RNA using Oligreen in a real-time polymerase chain reaction thermocycler. **Analytical Biochemistry**, v.372, pp. 116-118

Rodrigues-Silva, C. et al. 2015. 2015. Expression and immunohistochemical localization of the cytochrome P450 isoform 356A1 (CYP356A1) in oyster *Crassostrea gigas*. **Aquatic Toxicology**, v. 159, p. 267-275.

Salimi, M. et al. 2021. Study on Efficacy of 1% Permethrin Shampoo and Some Traditional Physical Treatment for Head Lice Infestation. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 12, n. 1, p. 1.

Sami, N.; Fatma, T. 2019. Studies on estrone biodegradation potential of cyanobacterial species. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 576-582.

Santa Catarina, 2018. **Recursos hídricos de Santa Catarina**. Secretaria executiva do meio ambiente (SEMA). Sistema de informações de recursos hídricos de Santa Catarina (SIRHESC), v. 1. 31 p. Disponível em: <https://www.aguas.sc.gov.br/base-documental/bacias-hidrograficas-do-estado>. Acesso em: 06/11/2023.

Santos, A. D. O. et al. 2022. Pharmaceuticals, natural and synthetic hormones and phenols in sediments from an eutrophic estuary, Jurujuba Sound, Guanabara Bay, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 184, p. 114176.

Santos-Echeandía, J. et al. 2021. The influence of natural vs anthropogenic factors on trace metal(loid) levels in the Mussel Watch Programme: two decades of monitoring in the Spanish mediterranean sea. **Marine Environmental Research**, v. 169, p. 105382.

Scott, A. P. 2012. Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? Part I: critical appraisal of the evidence for the presence, biosynthesis and uptake of steroids. **Steroids**, v. 77, n. 13, p. 1450-1468.

Scott, A. 2013. Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? II. Critical review of the evidence that steroids have biological effects. **Steroids**, v. 78, n. 2, p. 268-281.

Schmittgen and Livak, 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, 3 (6) (2008), pp. 1101-1108

Schwarz, T. I. et al. 2017. Mussels (*Mytilus* spp.) display an ability for rapid and high capacity uptake of the vertebrate steroid, estradiol-17 β from water. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 165, p. 407-420.

SEBRAE, 2019. **Cadernos de desenvolvimento SC - Itajaí**. 81 p. Disponível em: <https://datasebrae.com.br/municipios/sc/> Acesso em: 06/11/2023.

SEBRAE, 2019. **Cadernos de desenvolvimento SC – São Francisco do Sul**. 80 p. Disponível em: <https://datasebrae.com.br/municipios/sc/> Acesso em: 06/11/2023.

Serra-Compte, A. et al. 2018. Effects of water warming and acidification on bioconcentration, metabolization and depuration of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **Environmental Pollution**, v. 236, p. 824-834.

Sharifian, S. et al. 2020. New insights on the marine cytochrome P450 enzymes and their biotechnological importance. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 142, p. 811-821.

Sharma, A. et al. 2019. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. **Sn Applied Sciences**, v. 1, n. 11, p. 1-10.

Sies, H. et al. 2017. Oxidative Stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 715-748.

Silveira, Y. G.; Bonetti, J. 2018. Assessment of the physical vulnerability to erosion and flooding in a sheltered coastal sector: Florianópolis Bay, Brazil. **Journal Of Coastal Conservation**, v. 23, n. 2, p. 303-314.

Singh, B. K. 2009. Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 156-164.

Souza, M. C. O. et al., 2022. Legacy and emerging pollutants in Latin America: a critical review of occurrence and levels in environmental and food samples. **Science Of The Total Environment**, v. 848, p. 157774.

SNIS - Sistema Nacional de Informações em Saneamento. 2023. Painel de Regionalização dos Serviços de Saneamento Básico no Brasil. Disponível em: <http://appsnis.mdr.gov.br/regionalizacao-hmg/web/mapa/index?id=27>. Último acesso: 27/01/2023

- Souza et al. 2016. Metals and pesticides in commercial bivalve mollusc production areas in the North and South Bays, Santa Catarina (Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 15, p. 377-384.
- Souza et al. 2018. Presence of enteric viruses, bioaccumulation and stability in *Anomalocardia brasiliiana* clams (Gmelin, 1791). **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, p. 363-371.
- Sparks, C. et al. 2014. An analysis of historical Mussel Watch Programme data from the west coast of the Cape Peninsula, Cape Town. **Marine Pollution Bulletin**, v. 87, n. 1-2, p. 374-380.
- Stogiannidis, E., Laane, R. 2014. Source Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Using Their Molecular Indices: an overview of possibilities. **Reviews Of Environmental Contamination and Toxicology**, p. 49-133.
- Strott, C. A. 2002. Sulfonation and Molecular Action. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 5, p. 703-732.
- Sule, R. O. et al. 2022. A Common Feature of Pesticides: oxidative stress: the role of oxidative stress in pesticide-induced toxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. 1-31.
- Sun, R. et al. 2019. Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine organisms from Mischief Reef in the South China sea: implications for sources and human exposure. **Marine Pollution Bulletin**, v. 149, p. 110623.
- Sun, K. et al. 2021. A review of human and animals exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: health risk and adverse effects, photo-induced toxicity and regulating effect of microplastics. **Science Of The Total Environment**, v. 773, p. 145403.
- Tang, W. et al. 2018. Pyrethroid pesticide residues in the global environment: an overview. **Chemosphere**, v. 191, p. 990-1007.
- Tomanek, L. et al. 2011. Proteomic response to elevated PCO₂ level in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: evidence for oxidative stress. **Journal Of Experimental Biology**, v. 214, n. 11, p. 1836-1844.
- Tuttolomondo, A. et al. 2016. Immune-Inflammatory and Metabolic Effects of High Dose Furosemide plus Hypertonic Saline Solution (HSS) Treatment in Cirrhotic Subjects with Refractory Ascites. **Plos One**, v. 11, n. 12, p. 0165443.
- Upadhyay, A. et al. 2021. Ibuprofen-based advanced therapeutics: breaking the inflammatory link in cancer, neurodegeneration, and diseases. **Drug Metabolism Reviews**, v. 53, n. 1, p. 100-121.
- Valavanidis, A. et al. 2006. 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.

OOST, R.V.D.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149. [http://dx.doi.org/10.1016/s1382-6689\(02\)00126-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1382-6689(02)00126-6).

Vieira, C. E. D. et al. 2019. An integrated approach in subtropical agro-ecosystems: active biomonitoring, environmental contaminants, bioaccumulation, and multiple biomarkers in fish. **Science Of The Total Environment**, v. 666, p. 508-524.

Viganò, L. et al. 2023. The last 50 years of organic contamination of a highly anthropized tributary of the Po River (Italy). **Journal Of Environmental Management**, v. 326, p. 116665.

Xie, H. et al. 2019. Pharmaceuticals and personal care products in water, sediments, aquatic organisms, and fish feeds in the Pearl River Delta: occurrence, distribution, potential sources, and health risk assessment. **Science Of The Total Environment**, v. 659, p. 230-239.

Xu, E. G. et al. 2016. Revealing ecological risks of priority endocrine disrupting chemicals in four marine protected areas in Hong Kong through an integrative approach. **Environmental Pollution**, v. 215, p. 103-112

Yang, C.Y. et al. 2016. Responses to thermal and salinity stress in wild and farmed Pacific oysters *Crassostrea gigas*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 201, p. 22-29.

Yao, L. et al. 2017. Expression profiles of different glutathione S-transferase isoforms in scallop *Chlamys farreri* exposed to benzo[a]pyrene and chrysene in combination and alone. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 142, p. 480-488.

Walker, C. H. et al., 2016. **Principles of Ecotoxicology**. Londres: Taylor & Francis, p. 321.

Wang, Y. et al. 2020. Environmental impact and recovery of the Bohai Sea following the 2011 oil spill. **Environmental Pollution**, v. 263, p. 114343.

Wendel, A. 1981. Glutathione peroxidase. **Methods In Enzymology**, p. 325-333.

Wille, K. et al. 2011. Development of analytical strategies using U-HPLC-MS/MS and LC-ToF-MS for the quantification of micropollutants in marine organisms. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 5, p. 1459-1472.

Zacchi et al., 2017. Transcriptional changes in oysters *Crassostrea brasiliiana* exposed to phenanthrene at different salinities. **Aquatic Toxicology**, v. 183, pp. 94-103.

Zacchi, F. L. 2018. Biochemical and molecular responses in oysters *Crassostrea brasiliiana* collected from estuarine aquaculture areas in Southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 135, p. 110-118.

Zacchi et al., 2019. Differential responses in the biotransformation systems of the oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) elicited by pyrene and fluorene: molecular, biochemical and histological approach - part II. **Aquatic Toxicology**, v. 216, p. 105318

Zeng, X. et al. 2015. The positive relationship between ocean acidification and pollution. **Marine Pollution Bulletin**, v. 91, n. 1, p. 14-21.

Zhang, X. et al. 2011. Estrogenic Compounds and Estrogenicity in Surface Water, Sediments, and Organisms from Yundang Lagoon in Xiamen, China. **Archives Of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 61, n. 1, p. 93-100.

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

Zhang, G. et al. 2016. Molecular Basis for Adaptation of Oysters to Stressful Marine Intertidal Environments. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, n. 1, p. 357-381.

Zhang, C. et al. 2020. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in marine organisms from two fishing grounds, South Yellow Sea, China: bioaccumulation and human health risk assessment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 153, p. 110995.

Zheng, F. et al. 2020. Redox toxicology of environmental chemicals causing oxidative stress. **Redox Biology**, v. 34, p. 101475.

Zhong, R. et al. 2021. A critical review on the distribution and ecological risk assessment of steroid hormones in the environment in China. **Science Of The Total Environment**, v. 786, p. 147452.

Zhou, L. et al. 2016. Occurrence, spatiotemporal distribution, and ecological risks of steroids in a large shallow Chinese lake, Lake Taihu. **Science Of The Total Environment**, v. 557-558, p. 68-79.

Zhou, Y. et al. 2020. Study on the AhR signaling pathway and phase II detoxification metabolic enzymes isoforms in scallop *Chlamys farreri* exposed to single and mixtures of PAHs. **Environmental Research**, v. 190, p. 109980.

Zhou, Y. et al. 2022. Bioaccumulation and function analysis of glutathione S-transferase isoforms in Manila clam *Ruditapes philippinarum* exposed to different kinds of PAHs. **Journal Of Environmental Sciences**, v. 112, p. 129-139.

Zverev, S. A. et al. 2023. Evaluation of the efficacy of permethrin- and cypermethrin-based textile against taiga tick, *Ixodes persulcatus*. **Experimental And Applied Acarology**, v. 89, n. 2, p. 275-

3.7 Materiais e Informações Suplementares

Contaminantes emergentes e legados no litoral sul do Brasil (Santa Catarina): Uma abordagem multibiomarcadores em ostras *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757)

*Camila L. V. Bastolla*¹; *Fernando C. Guerreiro*⁵; *Miguel Saldaña-Serrano*¹; *Carlos H. A. M. Gomes*³; *Dáina Lima*¹; *Camila F. Rutkoski*⁵; *Jacó J. Mattos*²; *Vera Helena R. Vidal*¹; *Bárbara P. H. Righetti*¹; *Clarissa P. Ferreira*⁴; *Julia Martim*¹; *Thiago C. Alves*⁵; *Claudio M. R. Melo*³; *Maria R. F. Marques*¹; *Karim H. Lüchmann*⁴; *Eduardo A. Almeida*⁵; *Afonso C. D. Bairy*^{1*}

¹ Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

² Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola (NEPAq), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

³ Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

⁴ Departamento de Engenharia de Pesca e Ciências Biológicas, Universidade do Estado de Santa Catarina, UDESC, Laguna, Brasil

⁵ Departamento de Ciências Naturais, Fundação Universidade Regional de Blumenau, FURB, Blumenau, Santa Catarina, Brasil

Informação suplementar 1 (SI1): Análises dos contaminantes

1.1 Processamento das amostras e extração em fase sólida (SPE)

Para as análises químicas, a extração dos tecidos moles das ostras foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Fabunmi et al. (2020), a partir da adição de sulfato de sódio anidro sólido ao tecido descongelado das ostras (2:1, p/peso úmido). Na sequência, as amostras foram homogeneizadas, manualmente, com o auxílio de um pistilo e um almofariz. Ao homogenato, adicionou-se 16 mL da solução extrativa (1:1 v/v, ácido fórmico aquoso 0,1 M: metanol) em um tubo de centrífuga de 50 mL previamente exposto a um banho ultrassônico durante 15 min a 25°C e centrifugação a 5000 rpm por 10 min. O material sobrenadante foi utilizado para a etapa posterior. Para remoção de substâncias interferentes à quantificação dos compostos de

interesse foi realizada usando extração em fase sólida (SPE) utilizando uma coluna Chromabond® HR-X (500 mg, 6 mL, Marca Macherey-Nagel) e as condições de extração foram adaptadas de Gros et. al. (2012). A coluna foi condicionada com 15 mL de metanol grau HPLC, seguida por 15 mL de água destilada. A amostra foi carregada na SPE e, por fim, os analitos de interesse foram eluídos com 5 mL de metanol grau HPLC (Êxodo Científica).

1.2 Avaliação de poluentes orgânicos persistentes (POPs)

Foram quantificados 33 pesticidas: alacloro, atrazina, aldrin, cloroneb, clorobenzilato, Clorotalonil, clorpirifós, *cis*-Clordano, *trans*-Clordano, dieldrin, dactal, pp-DDE, pp-DDD, pp-DDT, Endosulfan I, endrin, hexaclorobenzeno, heptacloro, heptacloroepóxido, terbufos, trifluralina, metolacloro, molinato, metoxicloro, metribuzin, mirex, pendimetalina, propacloro, pentaclorobenzeno, *cis*-Permetrina, *trans*-Permetrina, simazina, terrazole. Os 18 congêneres de PCBs foram: 01, 05, 29, 18, 44, 60, 86, 101, 109, 138, 141, 151, 153, 170, 180, 181, 185, 207. Além destes, foram analisados os níveis de 13 HPAs: 2-metil naftaleno (2-mNAP), acenafteno (ACE), acenaftileno (ACY), antraceno (ANT), benzo(a)antraceno (BaA), benzo(a)pireno (BaP), benzo(b)fluoranteno (BbF), benzo(k)fluoranteno, criseno (CHR), fenantreno (PHE), fluoranteno (FLT), fluoreno (FLU) e pireno (PYR).

As análises de pesticidas, PCBs e HPAs foram realizadas em laboratório privado Laboprime (Timbó/SC) e determinadas através de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/MS), conforme escopo de acreditação ABNT NBR ISO/IEC 17025 (Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/laboratorios/rble/docs/CRL1171.pdf>).

1.3 Avaliação dos contaminantes emergentes (CE)

Em todas as amostras, os MPOs foram analisados em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) Dionex Ultimate 3000 com detector de arranjo de diodos (DAD), utilizando uma coluna Acclaim™ 120 C18 (4,6mm x 250mm, 5µm). A análise dos EDCs foi adaptada da metodologia de Verbinnen et. al. (2010). A fase móvel consistiu em água destilada (A) e acetonitrila (B) grau HPLC, em um gradiente que iniciou em 35% e aumentou gradualmente até 70% até os 15 minutos, sendo que a partir dos 16,5 min houve uma rampa que desceu até os 35% de B até 17,5 min, mantendo-se constante até o final. O tempo de análise foi de 18min a um fluxo de 1mL min⁻¹. A temperatura da coluna foi de 35°C e o volume de injeção foi de 20 µL. A análise dos compostos E1, E2 e EE2 foi realizada no comprimento de onda do detector

de 200 nm. Para as análises de E3 a leitura foi realizada em 254 nm, enquanto para o PD foi em 280 nm.

A análise de AINEs foi adaptada de Ascar et. al. (2013), sendo realizada com a fase móvel de acetonitrila (A) e uma solução de 50 nmol de Fosfato de Potássio Monobásico (K₂HPO₄) (B) a uma porcentagem de 55%. O tempo de análise foi de 35 min a um fluxo de 1 mL min⁻¹. A temperatura da coluna foi de 40°C e o volume de injeção foi de 20 µL. A análise de todos os AINEs foi realizada no comprimento de onda do detector de 220 nm.

Informação suplementar 2 (SI2): Identificação molecular das espécies

A identificação molecular de *C. gasar* foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Pie et al. (2006). O DNA genômico (gDNA) foi extraído a partir do manto de acordo com o método de extração *Salting Out*, com pequenas modificações (Miller, Dykes e Polesky, 1988). Posteriormente, o material extraído foi submetido a PCR-RFLP com amplificação das sequências dos genes rDNA16S: (16S.AR:'5-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3') e 16S.BR ('5-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3'). Por fim, foi realizada uma digestão com a enzima de restrição Anza 68 BsuRI (Invitrogen) e o produto foi analisado em gel de agarose 3%. Controles positivos foram usados com base nos diferentes tamanhos de produto: *C. gigas*: 395 pb, *C. gasar*: 235 pb e *C. rhizophorae*: 261 pb. A fotografia do gel foi realizada utilizando o fotodocumentador ChemiDoc (BioRad).

Informação suplementar 3 (SI3): Desenho dos iniciadores

As sequências de oligonucleotídeos utilizadas para a construção dos primers em ostras *C. gasar* foram obtidas a partir do transcriptoma realizado por Lüchmann et al. (2014). As sequências para qPCR foram desenhadas e analisadas usando o software PrimerQuest Tool (<http://www.idtdna.com>). No presente estudo foram avaliados 7 genes envolvidos na biotransformação de xenobióticos: três isoformas de Citocromo P450 (*CYP1A1-like*, *CYP2AUI-like* e *CYP356A1*), Glutathione S-Transferase (*GSTO-like*), Sulfotransferase (*SULT-like*) e Proteína de Choque Térmico (*HSP70-like*) (Tabela suplementar 1).

Referências

Ascar, L. et al. 2013. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Determination in Water Samples by HPLC-DAD under Isocratic Conditions. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 7, p. 1160-1166.

Fabunmi, I. et al. 2020. Multi-residue determination of micropollutants in Nigerian fish from Lagos lagoon using ultrasound assisted extraction, solid phase extraction and ultra-high-

performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 12, n. 16, p. 2114-2122.

Miller, S. A., Dykes, D. D., Polesky, H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 1215.

Pie, M. R et al. 2006. A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster species (*Crassostrea brasiliiana*, *C. rhizophorae* and *C. gigas*; Bivalvia: ostreidae) cultured in southern Brazil. **Aquaculture Research**, v. 37, n. 15, p. 1598-1600.

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

Verbinnen, R. T. et al. 2010. Determinação de hormônios estrógenos em água potável usando CLAE-DAD. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1837-1842.

Tabela S- 1. Genes selecionados, sequências de primers e tamanhos de amplicon em pares de base (pb).

Symbol	Gene name	Primer sequence 5'-3'	Amplicon (pb)	Efficiency (%)	Reference
<i>CYP1-like1</i>	<i>Cytochrome 450 1A1-like</i>	F - CCA GTG GGA ATC ACC AGA CAA ACC AGA A R - AGG AGG AGC TTC AGG CTG ACG AA	110	92	
<i>CYP2AU1-like</i>	<i>Cytochrome 450 2 AU 2</i>	F- AAC GGC AAG AGG TGT AAG GTT TGC R- TAA TCC ATC ACC CGG ATT GGC AGA CC	158	100	
<i>CYP356A1-like</i>	<i>Citocromo 450 356A1-like</i>	F - TGT TCA GGC CCA ACA ACT CTG TCA R - GGG AGT GGA CTC AAC CAG ATT CAC AA	114	100	Lüchmann et al., 2014
<i>GSTO-like</i>	<i>Glutathione-S-transferase Omega</i>	F- GGC GTA GGG ACA GAT CCG ATT AC R- AGG AGC TGA AAT GCC GAC TCA AA	175	99	
<i>SULT-like</i>	<i>Sulfotransferase-like</i>	F- CAC CTG TTA CCT CGC CAT ACT CCA R- ACT ACC ATG TCC TTC ATC AGG TCC C	149	98	

Tabela S-2 .Informações sobre os locais de amostragem para as ostras *Crassostrea gasar* nas regiões costeiras de Santa Catarina (Brasil) (consulte as localizações no mapa).

Região	Cidade	Ponto	Coordenadas geográficas	Descrição do ponto de amostragem
Norte	São Francisco do Sul	SF-A	26°20'07"S; 48°43'19"W	Baía da Babitonga - Ilha dos Barcos
		SF-B	26°20'04"S; 48°42'26"W	Baía da Babitonga - Ilha Comprida
Alto Vale do Itajaí	Itajaí	IT-A	26°55'02"S; 48°38'47"W	Foz do Rio Itajaí-Açú
Central	Florianópolis	BN-A	27°28'01"S; 48°31'01"W	Foz do Rio Ratonos - Estação Ecológica de Carijós (ESEC)
		BN-B	27°49'40"S; 48°37'15"W	Manguezal do Rio Ratonos
		BS-A	27°49'40"S; 48°37'15"W	Rio Maciambú
		BS-B	27°49'27"S; 48°37'26"W	Foz do Rio Maciambú
Sul	Laguna	LG-A	28°30'12"S; 48°45'44"W	Próximo à Lagoa do Noca

Tabela S-3. Dados de biometria das ostras *C. gasar* coletadas em diferentes locais da região costeira de Santa Catarina (Brasil): Região Norte - São Francisco do Sul (SF-A e SF-B); Alto Vale do Itajaí - Itajaí (IT-A); Região Central - Florianópolis: Baía Norte (BN-A e BN-B) e Baía Sul (BS-A e BS-B), Região Sul - Laguna (LG-A).

Região	Ponto	Altura (cm)	Largura (cm)	Comprimento (cm)	Peso da carne (g)
Norte	SF-A	5,90 ± 1,41	4,81 ± 2,04	3,49 ± 1,54	12,84 ± 5,95
	SF-B	5,78 ± 2,20	5,79 ± 1,69	2,71 ± 1,31	14,53 ± 7,46
Vale do Itajaí	IT-A	7,91 ± 0,76	2,20 ± 0,60	5,98 ± 0,78	8,96 ± 1,77
Central	BN-A	7,53 ± 3,16	2,75 ± 1,37	6,25 ± 2,16	10,07 ± 8,37
	BN-B	10,88 ± 2,05	3,63 ± 1,43	6,25 ± 1,20	17,77 ± 7,13
	BS-A	10,03 ± 3,64	3,73 ± 1,18	6,10 ± 1,06	23,76 ± 18,06
	BS-B	15 ± 3,69	5,21 ± 1,12	8,04 ± 1,04	51,53 ± 25,43
Sul	LG-A	18,25 ± 2,98	6,24 ± 1,69	10,98 ± 2,11	46,16 ± 8,07

Tabela S-4. Concentrações ambientais de contaminantes de preocupação emergente (AB: antibióticos, DE: desreguladores endócrinos, AINEs: anti-inflamatórios não-esteroidais, PES: pesticidas) detectados em amostras de ostras *Crassostrea gasar* coletadas em diferentes regiões costeiras de Santa Catarina (Brasil). Os resultados estão expressos em ng g⁻¹. Em negrito: valores de contaminantes quantificados em amostras de ostras.

Classe	Compostos	CAS n°	Log k _{ow}	SF-A	SF-B	IT-A	BN-A	BS-A	LG-A
AB	Azitromicina	83905-01-5	4,02	nd	nd	nd	nd	8,29	nd
	Ciprofloxacina	85721-33-1	0,28	0,38	0,39	0,28	0,29	0,23	0,28
	Eritromicina	114-07-8	3,06	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Sulfametoxazol	723-46-6	0,86	0,91	1,47	nd	nd	nd	nd
DE	Estrona	53-16-7	3,13	0,36	0,69	0,66	0,31	0,53	0,8
	Etinilestradiol	57-63-6	3,67	0,21	0,21	0,62	nd	0,41	1,82
	Prednisolona	50-24-8	1,62	0,58	0,83	nd	nd	0,84	nd
	Prednisona	53-03-2	1,46	1,36	1,35	1,39	0,87	0,99	1,21
	Progesterona	57-83-0	3,87	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AINEs	Acetaminofeno	103-90-2	0,46	1,81	1,83	nd	0,5	1,66	nd
	Ácido salicílico	69-72-7	2,26	3,01	2,22	2,22	3,02	5,07	6,15
	Furosemida	54-31-9	2,03	0,1	nd	nd	nd	nd	nd
	Ibuprofeno	15687-27-1	3,97	3,73	2,91	2,91	3,75	5,91	7,04
ΣCEs				12,4	11,9	8,0	8,7	23,9	17,3

Tabela S-5. Concentrações ambientais de pesticidas (PEST) detectados em ostras *C. gasar* coletadas em diferentes regiões costeiras de Santa Catarina (Brasil). Os resultados estão expressos em ng g⁻¹. Em negrito: valores de contaminantes quantificados em amostras de ostras.

Compostos	CAS n°	Log k _{ow}	SF-A	SF-B	IT-A	BN-A	BS-A	LG-A
Aldrin	309-00-2	6,50	0,04	0,07	0,53	0,12	nd	0,09
Endrin	72-20-8	5,20	0,22	nd	nd	0,65	0,04	0,06
Dieldrin	60-57-1	5,4	0,21	0,27	0,19	nd	0,37	0,42
Metoxicloro	72-43-5	5,08	0,05	0,06	0,69	nd	0,06	0,18
Metolacloro	51218-45-2	3,13	0,11	0,11	0,06	0,04	0,09	0,10
Heptacloro	76-44-8	6,10	0,27	0,20	0,48	0,08	0,19	0,24
Heptacloroepóxido	1024-57-3	5,40	0,69	0,05	22,67	0,89	nd	
Alacloro	15972-60-8	3,52	0,12	0,15	0,04	0,68	0,13	0,11
Cloroneb	2675-77-6	3,44	nd	nd	0,07	0,46	nd	nd
Propacloro	1918-16-7	2,18	0,38	nd	0,16	0,62	0,72	0,49
Pentaclorobenzeno	608-93-5	5,18	nd	nd	0,16	0,27	1,73	nd
Hexaclorobenzeno	118-74-1	5,73	nd	0,60	nd	0,52	nd	0,26
Clorotalonil	1897-45-6	3,05	nd	0,06	0,60	0,22	0,21	1,30
Clorobenzilato	510-15-6	4,74	0,10	0,06	nd	0,20	0,04	0,05
Clorpirifós	2921-88-2	4,49	0,53	0,10	0,13	0,21	0,66	1,48
Terrazole	2593-15-9	3,37	0,04	nd	0,04	0,12	0,28	nd
Molinato	2212-67-1	3,21	0,07	0,05	0,69	0,14	0,14	0,04
Pendimetalina	40487-42-1	5,20	0,12	0,75	0,26	nd	0,08	nd
Trifluralina	1582-09-8	5,34	nd	0,04	0,12	nd	nd	nd
Simazina	122-34-9	2,18	0,04	0,09	0,41	nd	0,04	0,04
Atrazina	1912-24-9	2,61	0,15	0,27	0,16	0,04	0,11	0,50
Terbufos	13071-79-9	4,48	0,07	nd	nd	nd	nd	nd
Endosulfan I	1031-07-8	3,83	0,14	0,53	0,38	0,15	0,61	0,08
Metribuzin	21087-64-9	1,70	0,10	0,11	0,10	0,24	0,42	0,54
Mirex	2385-85-5	6,89	nd	nd	0,21	nd	0,12	0,08
Dactal	1861-32-1	4,40	0,16	0,04	0,04	nd	nd	1,93

trans-Clordano	57-74-9	6,16	nd	nd	nd	nd	nd	0,05
cis-Clordano	5103-74-2	6,16	nd	nd	0,04	nd	nd	nd
cis-Permetrina	54774-46-8	6,50	0,04	22,15	0,25	0,08	0,64	0,16
trans-Permetrina	51877-74-8	6,50	0,09	0,05	0,8	0,2	0,18	0,05
pp-DDE	68679-99-2	6,51	0,27	0,18	0,14	0,04	0,26	0,17
pp-DDD	128-95-0	6,02	nd	nd	nd	nd	0,30	0,16
pp-DDT	50-29-3	6,91	0,51	0,54	0,67	0,22	nd	0,05
Σ_{33}PEST			12,2	55,6	56,1	40,6	30,7	16,9

Tabela S-6. Concentrações de HPAs (ng g^{-1} , peso úmido) detectadas em ostras *C. gasar* coletadas em áreas costeiras de Santa Catarina (Brasil).

Nome	Sigla	Log k _{ow}	n° anéis	SF-A	IT-A	BN-B
2-metil naftaleno	2-mNAP		2	0,14	0,95	0,06
Acenafteno	ACE	3,92	3	0,05	0,07	1,36
Acenaftileno	ACY	3,93	3	nd	0,13	nd
Antraceno	ANT	4,45	3	0,09	nd	0,05
Benzo(a)antraceno	BaA	5,76	4	1,25	nd	nd
Benzo(a)pireno	BaP	6,13	5	0,75	nd	nd
Benzo(b)fluoranteno	BbF	5,78	5	0,09	nd	nd
Benzo(k)fluoranteno	BkF	6,11	5	nd	0,06	0,18
Criseno	CHR	5,73	4	0,11	0,09	0,07
Fenantreno	PHE	4,46	3	nd	nd	0,72
Fluoranteno	FLT	5,16	4	0,31	0,39	nd
Fluoreno	FLU	4,16	3	0,13	0,04	nd
Pireno	PYR	4,88	4	nd	0,03	nd
Σ_{13}HPAs				2,92	1,76	2,39
Σ_{2-3} anéis				0,41	1,19	1,42
Σ_{4-6} anéis				2,51	0,57	0,97
ΣLMW/ΣHMW				0,16	2,09	1,46

Tabela S -7. Concentrações de PCBs (ng g⁻¹, peso úmido) detectadas em ostras *C. gasar* coletadas em áreas costeiras de Santa Catarina (Brasil).

Código	CAS	Composto	n° Cl	SF-A	SF-B	IT-A	BN-A	BS-A	LG-A
PCB 1	2051-60-7	2-Clorobifenila	1	nd	0,06	nd	0,07	nd	0,1
PCB 5	16605-91-7	2,3-Diclorobifenila	2	0,17	0,63	0,37	0,07	0,35	0,06
PCB 29	15862-07-4	2,4',5'-Triclorobifenila	3	0,16	0,05	0,08	0,2	0,09	nd
PCB 18	37680-65-2	2,2',5'-Triclorobifenila	3	0,34	0,12	0,06	0,82	0,1	0,12
PCB 44	41464-39-5	2,2',3,5'-Tetraclorobifenila	4	nd	1,57	nd	nd	nd	nd
PCB 60	33025-41-1	2,3',4,4'-Tetraclorobifenila	4	0,11	nd	nd	nd	nd	0,42
PCB 86	55312-69-1	2,2',3,4,5'-Pentaclorobifenila	5	nd	2,72	0,22	6,1	0,19	0,16
PCB 101	37680-73-2	2,2',4,5,5'-Pentaclorobifenila	5	0,35	0,04	nd	1,25	nd	0,12
PCB 109	74472-35-8	2,3,3',4',6-Pentaclorobifenila	5	0,04	0,09	nd	0,12	nd	0,13
PCB 138	35065-28-2	2,2',3,4,4',5'-Hexaclorobifenila	6	0,1	nd	nd	37,5	0,62	nd
PCB 141	52112-04-6	2,2',3,4,5,5'-Hexaclorobifenila	6	nd	0,04	nd	nd	nd	nd
PCB 151	52663-63-5	2,2',3,5,5',6-Hexaclorobifenila	6	0,06	nd	nd	nd	nd	0,07
PCB 153	35065-27-1	2,2',4,4',5,5'-Hexaclorobifenila	7	0,04	1,72	nd	nd	nd	nd
PCB 170	35065-30-6	2,2,3,3,4,4,5-Heptaclorobifenila	7	nd	nd	0,56	nd	0,08	nd
PCB 180	35065-29-3	2,2',3,4,4',5,5'-Heptaclorobifenila	7	0,04	4,61	nd	nd	nd	0,07
PCB 181	74472-47-2	2,2',3,4,4',5',6-Heptaclorobifenila	7	0,05	0,44	20,94	nd	nd	nd
PCB 185	52712-05-7	2,2',3,4',5,5',6-Heptaclorobifenila	7	nd	0,88	nd	1,83	nd	nd
PCB 207	52663-79-3	2,2',3,3',4,4',5,5',6-Nonaclorobifenila	9	1,08	nd	111,1	nd	nd	nd
Σ₁₈PCB				2,54	12,97	133,33	47,96	1,43	1,25

CAPÍTULO IV

4. Respostas bioquímicas e moleculares em ostras *Crassostrea gigas* expostas à duas concentrações ambientalmente relevantes de cocaína

*Camila L. V. Bastolla*¹; *Vanessa S. Deconto*³; *Mariana R. Pilotto*³; *Daina Lima*³; *Lígia S. Lanzarin*¹; *Clei E. Pizza*³; *Pedro A. Mattos*¹; *Miguel S. Serrano*¹; *Carlos H. A. M. Gomes*³; *Jacó J. Mattos*²; *Vera H. V. Dias*³; *Camilo D. S. Pereira*⁴; *Afonso C. D. Bainy*^{1*}

¹ Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

² Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola (NEPAq), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

³ Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

⁴ Laboratório de Ecotoxicologia, Universidade Santa Cecília, Santos, Brasil

Artigo redigido de acordo com as normas da revista *Aquatic Toxicology* (QUALIS-1; IF: 5.202).

4.1 Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar as respostas moleculares e bioquímicas (fase I e II de biotransformação, defesa antioxidante e neurotransmissão) em brânquias de ostras *Crassostrea gigas* expostas à 0,5 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cocaína (COC) durante 24h e 96h. Foram avaliados os níveis de transcritos de citocromo P450 (*CYP1A-like1*, *CYP356A1-like*), carboxilesterase (*CbE4A-like*, *CbE54-like*), 5-hidroxitriptofano (*5HT-like*), receptor de dopamina (*DOP2R-like*), superóxido dismutase (*SOD-like*), catalase (*CAT-like*) após 24h de exposição por qPCR-RT. Além disso, também monitoramos a atividade das enzimas 7-etoxiresorufina O-deetilase (EROD) e glutathiona S-transferase (GST) neste período. Biomarcadores bioquímicos envolvidos na defesa antioxidante superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e dano oxidativo (MDA) foram avaliados após 96h. Ostras *C. gigas* expostas a COC apresentaram uma significativa regulação negativa nos níveis de transcritos dos genes envolvidos na fase I de biotransformação (*CYP1A-like1*, *CYP356A1*) e defesa antioxidante (*CAT-like*), em relação ao controle. Por outro lado, observamos um aumento significativo nos transcritos de *CbE5A-like* em ostras expostas a ambas concentrações avaliadas. Esses sugerem uma maior afinidade das esterases pela COC, além de uma regulação negativa dos *CYP450* frente ao aumento de EROs. Ostras *C. gigas* expostas a menor concentração também apresentaram uma diminuição nos níveis de transcritos de *5HT-like*, alertando para possíveis alterações em processos fisiológicos coordenados pelo sistema serotoninérgico. Em relação às respostas bioquímicas, observamos uma redução nas atividades SOD, CAT e GPx em animais expostos a ambas concentrações de COC. No entanto, não foi observado aumento na peroxidação lipídica entre os grupos expostos, sugerindo possível envolvimento do sistema serotoninérgico na modulação da resposta ao estresse oxidativo. Por fim, nossos resultados indicam que as concentrações ambientais de cocaína avaliadas podem causar alterações moleculares e bioquímicas em ostras do Pacífico.

Palavras-chave: drogas ilícitas, CYP450, esterases, ostra do Pacífico, serotonina, qPCR

4.2 Abstract

This study aimed assess molecular and biochemical responses (phase I and II biotransformation, antioxidant defense, and neurotransmission) in the gills of *Crassostrea gigas* oysters exposed to 0.5 and 5.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ of cocaine (COC) for 24h and 96h. Transcript levels of cytochrome P450 (*CYP1A-like1*, *CYP356A1-like*), carboxylesterase (*CbE4A-like*, *CbE54-like*), 5-hydroxytryptophan (*5HT-like*), dopamine receptor (*DOP2R-like*), superoxide dismutase (*SOD-like*), and catalase (*CAT-like*) were evaluated after 24h of exposure by qPCR-RT. Additionally, the activities of 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) and glutathione S-transferase (GST) enzymes were monitored during this period. Biochemical biomarkers related to antioxidant defense superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and oxidative damage (MDA) were assessed after 96h. Oysters *C. gigas* exposed to COC exhibited a significant downregulation in the transcript levels of genes involved in *CYP1A-like1*, *CYP356A1-like*, *CAT-like* compared to the control. On the other hand, there was a significant increase in the transcripts of *CbE5A-like* in oysters exposed to both evaluated concentrations, suggesting a higher affinity of esterases for COC and a negative regulation of *CYP450* in response to increased ROS. Oysters exposed to the lower concentration also showed a decrease in *5HT-like* transcript levels, indicating potential alterations in physiological processes coordinated by the serotonergic system. Regarding biochemical responses, a reduction in the

activities of SOD, CAT, and GPx was observed in animals exposed to both COC concentrations. However, there was no increase in lipid peroxidation among the exposed groups, suggesting possible involvement of the serotonergic system in modulating the response to oxidative stress. In conclusion, our results indicate that the evaluated environmental concentrations of cocaine can cause molecular and biochemical alterations in Pacific oysters.

Key-words: illicit drugs, CYP450, esterase, *Pacific oyster*, serotonin, qPCR

4.3 Introdução

O consumo de drogas ilícitas é um desafio de saúde pública em todo o mundo, permeando os diferentes estratos sociais. Segundo o World Drugs Report, em 2020, estima-se que 284 milhões de pessoas (faixa etária entre 15 – 64 anos) consumiram drogas ilícitas, representando um aumento de 26% em relação à 2010 (UNODC, 2022). Essa problemática é abordada na Agenda 2030, especificamente no ODS 3, que visa garantir vidas saudáveis e promover o bem estar para todos, em todas as idades (<https://www.un.org/sustainabledevelopment/>).

A cocaína (COC), um dos psicoativos mais consumidos no mundo, é produzida a partir da planta *Erythroxylum coca* (UNODC, 2022). O mecanismo de ação da COC envolve a inibição da recaptação de monoaminas, como dopamina (DOPA), serotonina (5-hidroxitriptamina) e norepinefrina na fenda sináptica, resultando em diversos efeitos fisiológicos como aumento da frequência cardíaca, vasoconstrição, hipertermia, dilatação das pupilas, estimulação psicomotora e falta de apetite (Bravo et al., 2022).

Após a ingestão, o tempo de meia-vida plasmática da COC é estimado entre 70-150 min, sendo metabolizada principalmente por esterases hepáticas e, em parte, por pseudocolinesterases plasmáticas em humanos. A excreção ocorre via urina e fezes, sendo 1 a 9% excretados como cocaína inalterada e o restante como os metabólitos, benzoilecgonina (BE) (35-54%), éster metílico de ecgoína (32-49%) e norcocaína (5%) (Inaba, 1989).

O esgoto sanitário é considerado a principal fonte de contaminação de drogas ilícitas nos ambientes aquáticos, evidenciando a ineficácia ou inexistência das estações de tratamento de esgoto (ETEs) na remoção de COC (Yadav et al., 2017; 2019). Estudos recentes relatam a ocorrência de COC (concentrações entre ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$) em água para consumo (Campestrini et al., 2017), ETEs (Zhao et al., 2022; Marcantonio et al., 2023), águas superficiais (Watanabe et al., 2020; Davey et al., 2022) e em ambientes costeiros (Pereira et al., 2016; Fontes et al., 2019; Roveri et al., 2021; Pisseta et al., 2022) em todo o mundo.

Neste contexto, os ambientes marinhos apresentam maior susceptibilidade à presença de contaminantes ionizáveis, incluindo os compostos farmacêuticos e drogas ilícitas, em relação aos ambientes de água doce, devido a influência do pH na biodisponibilidade e na toxicidade dos compostos (Carter et al., 2022). Pereira et al (2016) destacam o aumento do coeficiente de partição octanol-água (Log Kow) da cocaína ($pK_a = 8,61$) de 0,10 (forma iônica) para 2,30 (forma não-iônica) nestes ambientes como um fator que favorece os processos de absorção e bioacumulação.

A ocorrência de COC representa um risco para os ecossistemas costeiros, desencadeando efeitos adversos na biota aquática. Fontes et al. (2020) revisaram os efeitos biológicos da exposição à cocaína em diferentes organismos aquáticos, como moluscos bivalves *Perna perna* e *Dreissena polymorpha*, peixes *Danio rerio*, *Anguilla anguilla*, ouriço do mar *Echinometra lucunter* e crustáceos *Orconectes rusticus* e *Daphnia magna*. Foram identificadas diversas respostas biológicas, incluindo citotoxicidade, indução das vias de estresse oxidativo e biotransformação (fase I e II), desordens locomotoras e comportamentais, desbalanço energético, genotoxicidade e desregulação endócrina. (Fontes et al., 2020).

Neste contexto, estudos ecotoxicológicos baseados na avaliação de uma bateria de biomarcadores são amplamente utilizados como ferramenta para o monitoramento da qualidade ambiental em áreas poluídas. Neste sentido, moluscos bivalves estão entre as espécies bioindicadoras mais utilizadas para monitorar múltiplos estressores nos ambientes costeiros, devido sua natureza sésil, capacidade de bioacumular contaminantes em seus tecidos moles, ampla distribuição geográfica, papel ecológico e importância comercial (Chahouri et al., 2023). Fiorito et al (2021) destacam a ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), a espécie mais cultivada no mundo, como um bom modelo para avaliação da poluição por contaminantes antropogênicos nos ambientes marinhos (FAO, 2022).

Neste estudo investigamos as respostas moleculares e bioquímicas em ostras do Pacífico expostas a cocaína durante 24h e 96h. Foram avaliados biomarcadores envolvidos nas fases I (Citocromo P450 e Carboxilesterase) e II (Glutathione S-Transferase e Sulfotransferase) de biotransformação de xenobióticos, defesa antioxidante e neurotransmissão nas brânquias de *C. gigas*. Com o objetivo de fornecer subsídios aos processos de tomada de decisão em relação à poluição por cocaína em ambientes costeiros, foram considerados dois cenários ambientalmente relevantes no contexto brasileiro: $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (Baía de Santos, São Paulo) (Fontes et al., 2019) e $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (Rio Igarapé, Manaus) (Thomas et al., 2014).

4.4 Material e Métodos

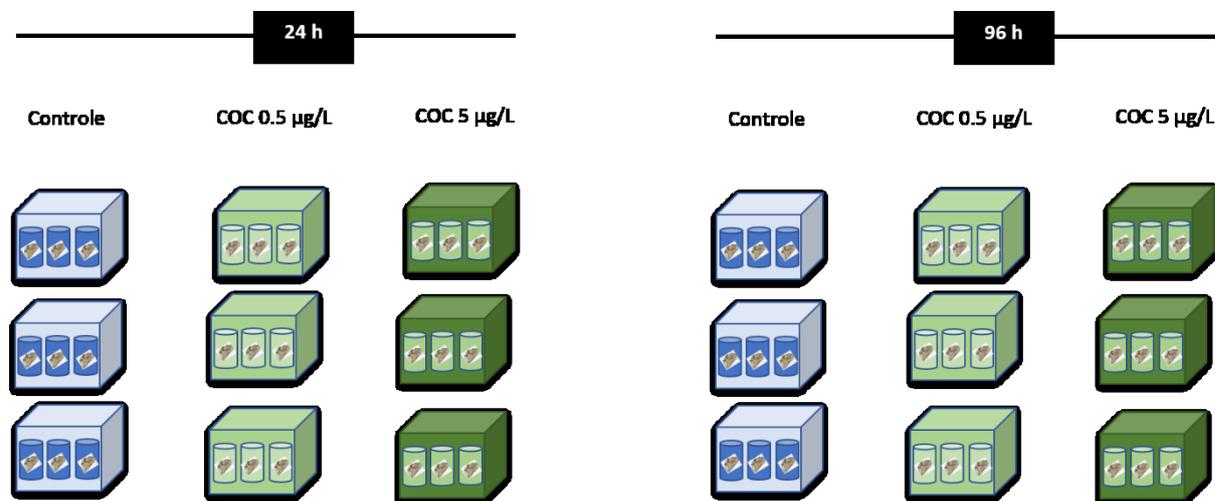
4.4.1 Delineamento experimental e exposição das ostras à cocaína

Ostras *Crassostrea gigas* adultas ($5,5 \pm 1,0$ cm) foram obtidas através do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM/UFSC) da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, Brasil), onde foram aclimatadas durante 10 dias em condições controladas: sistema de recirculação contínua, temperatura ($20 \pm 0,5^\circ\text{C}$), salinidade (30 ‰), pH ($7,8 \pm 0,1$), fotoperíodo (12h:12h), amônia ($< 0,25$).

Ao final do período de aclimação, as ostras ($n = 72$) foram transportadas até o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI/UFSC) e distribuídas em béqueres de vidro (1 ostra: 1L de água do mar). A exposição das ostras foi realizada em triplicata, sendo 4 béqueres de 1 L para cada grupo: controle (CT) (acetonitrila 0,05%), $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (E1) e $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (E2) durante 24h e 96h (Fig. 1). O preparo das respectivas concentrações foi realizado a partir da solução padrão de cocaína (1 mg mL^{-1} em acetonitrila, 99% pureza) obtida a partir de Cerilliant (Sigma Aldrich), e em aquários de 30 L. Após, os respectivos volumes foram transferidos para cada unidade experimental nas respectivas concentrações e tempos de exposição.

Durante o período experimental, as ostras foram alimentadas, a cada 48h, com microalgas *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros muelleri* (proporção 1:2, concentração de 20 a 25×10^4 células mL^{-1}). Este regime de alimentação foi adotado com o objetivo de padronizar o período de jejum (24h) dos animais entre as coletas de tecidos (24h e 96h). Após a exposição, os animais tiveram parte de brânquias coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C para posteriores análises moleculares. No momento da coleta, parte das brânquias foram processadas para os biomarcadores bioquímicos (Conforme descrito no item 4.4.3). O restante dos tecidos moles das ostras foi destinado para avaliação da bioconcentração de cocaína.

Figura 1. Esquema de exposição das ostras *Crassostrea gigas* à duas concentrações ambientalmente relevantes de cocaína. As ostras foram expostas durante 24h e 96h às concentrações de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (n = 1 ostra/béquer, totalizando 12 ostras por tratamento). O controle foi composto por água do mar e acetonitrila 0,05%.



4.4.2 Extração de RNA total, transcrição reversa e análises de RT-qPCR

A extração de RNA total foi realizada a partir de 80 mg de brânquias de ostras (n = 10) coletadas após 24h de exposição, com o uso do reagente QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Alemanha), conforme instruções do fabricante. A concentração e as relações de pureza (260/280 e 260/230) do RNA foram avaliados em espectrofotômetro Nanodrop One (Thermo Scientific, USA). A transcrição reversa foi realizada com o uso do kit Quantitect Reverse Transcription (Qiagen, Alemanha) a partir de 1 μg de RNA total, de acordo com o fabricante. Por fim, as amostras de cDNA foram diluídas para as corridas de RT-qPCR (1:80) e normalização dos genes (1:20). Após, foram armazenadas em freezer -20°C .

Os iniciadores foram desenhados no software PrimerQuest Tool (www.idtdna.com.br) com base nas sequências nucleotídicas disponíveis no genoma de *C. gigas* (Zhang et al., 2012). Foram avaliados os níveis de transcritos de duas isoformas do Citocromo P450 (*CYP1A-like*, *CYP356A1-like*), duas isoformas de Carboxilesterase (*CbE4A-like* e *CbE5A-like*), 5-Hidroxitriptofano (*5HT-like*), Receptor de dopamina (*DOP2R-like*), Superóxido dismutase (*SOD-like*), Catalase (*CAT-like*) (Tabela 1).

As reações foram realizadas em termociclador Rotor Gene™ 6000 (Qiagen) utilizando o kit SYBR Green PCR (Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A fim de monitorar a eficiência (E) de cada iniciador, foi realizada uma curva de calibração de cDNA (800; 400; 200; 100 e 50 ng). Todas as curvas de calibração dos respectivos

genes-alvo apresentaram R^2 maior que 0,99 e eficiência entre 95 a 105%. A concentração de cDNA presente nas amostras foi utilizada como fator de normalização dos dados (Rhin et al., 2008). Todos os dados foram calibrados pelos níveis de mRNA de ostras do grupo controle e os resultados foram analisados pelo método 2^{-Cq} (Schmittgen e Livak, 2008).

Tabela 1. Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação dos genes envolvidos na biotransformação, neurotransmissão e defesa antioxidante e suas respectivas identificações do código de acesso no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov):

Sigla	Sequência dos iniciadores 5'-3'	Amplicon (pb)	Acesso GenBank
<i>CYP1-like</i>	F - GCC CAC GGT TGT AAT ATG CGG TAA AG R - GGC TCT TCA TGT CGT TCA GAC TCT TGA T	119	XM_011442190.1 XM_011458840. XM_011458841.1
<i>CYP356A1-like</i>	F - TGA AAC CTT CCA GCC AGG AGT CAA CA R - GGT CTG AAC GAC GTG CGT ATC CA	121	EF645271.1
<i>CbE4A-like</i>	F - TGG TCC TAG CAC TGT CCC GTA AAT R - TGG GTG GGT TTG ATT GTG TGT CTC	119	XM_011452013.3
<i>CbE5A-like</i>	F - CTT TCC CGA CCA ACC AAC CAA A R - GCC TGA AGT TGC TCC AGT CAA A	97	XM_011440222.3
<i>5HT-like</i>	F - GAA AGC ATC GCC AAC TTC CAG TAC G R - ACC GCC ACC ATC AGG TCA GTA A	203	XM_011451787.3
<i>DOP2R-like</i>	F - ACA AAC GAG GCG TGG CAA AGT T R - TCA TCC AGG TGA CAC ATT GGG TTA GTG	220	XM_034448260.1
<i>SOD-like</i>	F - GGC CCT CAA TCC ATC ATT GGA AGA R - TGA TAC CGA TCA CTC CAC AAG CCA		AJ496219.1
<i>CAT-like</i>	F - AGC TAA TCG TTT GTC TGC CGA GGA R - ACA CTT TGG TCA CAT CGA ACG GGT		EF687775.2

4.4.3 Avaliação das enzimas envolvidas na biotransformação e defesa antioxidante

No momento da dissecação dos animais, 400 mg de brânquias por amostra ($n = 10$) foram homogeneizados (1:5, p/v) em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4, contendo 0,5 M sacarose; 0,15 M KCl; 1 mM DTT e 0,1 mM PMSF. O homogenato foi centrifugado a 9000 xg por 30 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi submetido a ultracentrifugação a 100.000 xg durante 60 minutos a 4°C. O sobrenadante (SN) resultante foi separado em alíquotas e armazenado em freezer -80°C para análises de GST total e enzimas envolvidas na defesa antioxidante (SOD, CAT, GPx, GR e G6PDH). Os microsomas foram ressuspendidos em tampão de homogeneização sem DTT e PMSF. As amostras foram submetidas a nova ultracentrifugação a 100.000 xg por 20 min a 4°C. A fração microsomal foi diluída em tampão de microsoma (tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4, 0,15 M KCl, 20% glicerol).

Conforme descrito por Siebert et al (2017), a avaliação da atividade 7 etoxiresorufina O-deetilase (EROD) foi realizada através da quantificação da resorufina 119 em espectrofotômetro com excitação a 530 nm, emissão a 585 nm, *cutoff* a 550 nm e alta PMT por 1 h, com intervalos de leitura de 1 min. A quantificação da atividade GST total foi realizada conforme Keen et al (1976), através da formação do conjugado GS-DNB monitorado a 340 nm.

A atividade Superóxido Dismutase (SOD) foi determinada a partir da inibição na redução de citocromo C na presença de ânions superóxido mensurado a 550 nm (McCord e Fridovich et al (1969). A atividade catalase (CAT) foi avaliada através da decomposição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em oxigênio molecular (O₂) e água, quantificado em 240 nm (Aebi, 1984). A atividade Glutationa Peroxidase (GPx) foi determinada de acordo com Wendel (1981) através da decomposição de hidroperóxido de cumeno (Cu-OOH) em 340 nm. A detecção da atividade Glutationa Redutase (GR) foi avaliada a partir da oxidação de NADPH a 340 nm (Carlberg; Mannervik, 1985). A atividade Glicose 6-Fosfato desidrogenase (G6PDH) foi observada a partir da redução de NADP⁺ a NADPH mensurada em 340 nm durante 5 min (Glock; McLean, 1953). Por fim, os ensaios enzimáticos foram normalizados a partir da concentração de proteínas totais presentes nas frações microssomais e citosólicas através do ensaio de Bradford (Bradford, 1976).

4.4.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram conduzidas no software GraphPad Prism® versão 7.00. Os dados foram previamente avaliados quanto à presença de outliers (Teste de Grubbs), normalidade (Teste Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Teste de Bartlett). Em seguida, os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação das médias, com nível de significância $p < 0,05$. Os dados dos biomarcadores bioquímicos e moleculares estão apresentados como média \pm desvio-padrão. A normalização dos genes foi realizada em relação aos grupos controle (acetonitrila 0,005%).

4.5 Resultados e discussão

4.5.1 Respostas moleculares e bioquímicas envolvidas na biotransformação (fase I e II) em brânquias de *C. gigas*

Neste estudo foram observadas alterações significativas na fase I de biotransformação, indicando vias prioritárias para a metabolização de cocaína em ostras do Pacífico. Os resultados dos biomarcadores avaliados nas brânquias de *C. gigas* estão apresentados na Figura 1.

A estrutura química da COC compreende diferentes grupos funcionais susceptíveis a biotransformação, incluindo N-metil, éster carboxil e éster benzoílo. Em humanos, a via das esterases desempenham um papel crucial na biotransformação de COC, gerando os metabólitos primários éster metílico de ecgonina e benzoilecgonina. Além disso, a via do Citocromo P450 (*CYP450*) contribui, em menor escala, para a N-desmetilação de COC, formando norcocaína, um metabólito farmacologicamente ativo e semelhante ao composto parental (Inaba, 1989).

Neste estudo, ostras *C. gigas* expostas a 0,5 µg L⁻¹ e 5 µg L⁻¹ de COC durante 24h apresentaram uma indução nos transcritos de *CbE5A-like* (2 a 3 vezes, respectivamente) em relação ao grupo controle (Fig. 1D). Por outro lado, não foram observadas alterações significativas nos transcritos de *CbE4A-like* neste estudo (Fig. 1C). Esses resultados são inéditos em relação aos estudos realizados com bivalves marinhos expostos a COC previamente reportados na literatura. Solé et al (2021) relataram resultados similares na atividade CbE em minhocas *Lumbricus terrestris* expostas à COC, em ensaio enzimático utilizando o substrato 4-nitrofenil butirato (4NPB), considerado mais adequado para avaliação da CbE em invertebrados (Otero; Kristoff, 2016, Solé; Sanchez-Hernandez, 2018, Solé; Freitas; Rivera-Ingraham, 2021).

A superfamília dos *CYP450*, em especial as famílias 1-3 estão diretamente envolvidas na biotransformação de diferentes classes de xenobióticos, além de atuar no metabolismo de drogas (Guengerich, 2008). Em nosso estudo, ostras *C. gigas* expostas à 0,5 µg L⁻¹ e 5 µg L⁻¹ durante 24h apresentaram uma regulação negativa nos níveis de transcritos de *CYP1A-like* (3,6 vezes e 2,3 vezes, respectivamente) em relação ao grupo (Fig. 1A). No entanto, não observamos alterações significativas na atividade EROD (Fig. 1F). Resultados similares foram observados em brânquias e glândula digestiva de *P. perna* expostos a crack cocaína (0,5 e 5 µg L⁻¹) (Ortega et al., 2018).

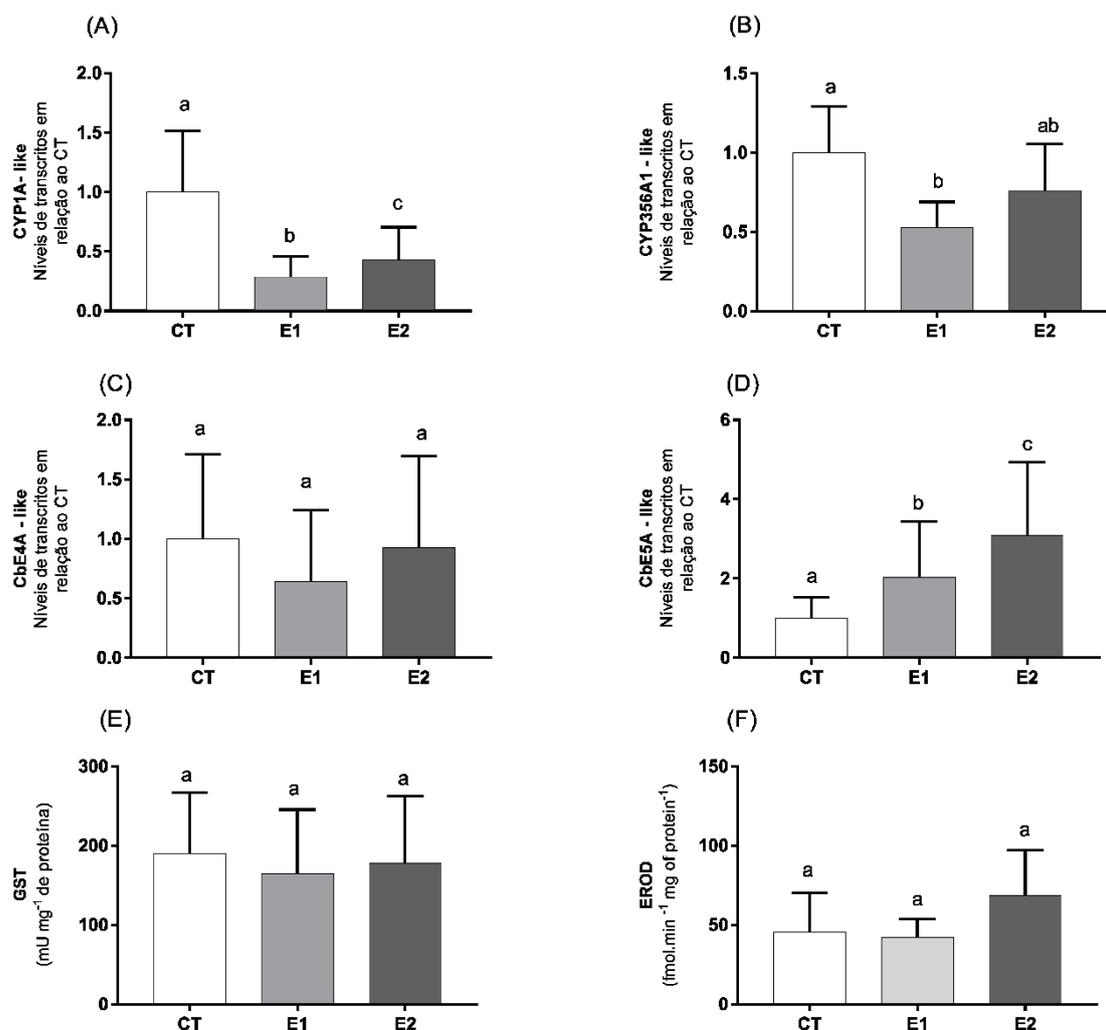
A subfamília CYP3 é bem descrita pelo seu envolvimento no metabolismo de drogas, como a cocaína, em vertebrados (Arinç et al., 2003). Em invertebrados, Toledo et al (2008) relataram uma proximidade evolutiva entre *CYP356A1* e os membros de *CYP17* e *CYP1* em ostras *C. gigas*, evidenciando o envolvimento dessa isoforma no metabolismo de esteróides e na biotransformação de xenobióticos.

Além do *CYP1A-like*, observamos também uma redução na transcrição do gene *CYP356A1-like* (1,9 vezes) em ostras expostas à menor concentração de COC, quando comparadas ao grupo controle (Fig. 1B). Almeida et al (2018) relataram uma resposta similar nos transcritos de CYP3 em brânquias de *Ruditapes philippinarum* expostos a 1 µg L⁻¹ do antiepilético carbamazepina. Por outro lado, mexilhões *P. perna* expostos à crack cocaína (5

e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) durante 48h apresentaram um aumento na atividade catalítica de *CYP3A-like* (dibenzilfluoresceína, DBF) (Ortega et al., 2018).

O estresse oxidativo pode interferir na regulação transcricional de genes citocromo P450, incluindo *CYP1A* (Morel; Barouki, 1998). Esse processo é negativamente autoregulado pelo aumento nos níveis intracelulares de EROS, como H_2O_2 , ou em condições de depleção de glutatona (Morel; Barouki, 1999), contribuindo para a regulação redox. Portanto, esse mecanismo pode estar relacionado à redução nos níveis de transcritos de *CYP1A-like* e *CYP356A1-like* observados nas ostras *C. gigas* expostas a cocaína. Em uma visão global das respostas envolvidos na fase I de biotransformação em ostras *C. gigas*, nossos resultados sugerem uma maior afinidade das esterases pela cocaína, em relação ao CYP450, destacando a predominância das reações de hidrólise sob as de oxidação. Neste estudo não observamos alterações significativas na atividade GST (Fig. 1E). Esses resultados são similares aos achados de Felice & Parolini (2020), onde mexilhões *Mytilus galloprovincialis* expostos à COC (500 ng L^{-1}), BE (20 ng L^{-1}) e sua mistura durante 96h também não observaram alterações na fase II de biotransformação.

Figura 2. Níveis de transcritos dos genes (A) *CYP1A-like*; (B) *CYP356A1-like*; (C) *CbE4A-like*; (D) *CbE5A-like* e atividade das enzimas Glutaciona S-Transferase (GST) (E) e 7-etoioresorufina O-deetilase (EROD) (F) em brânquias de ostras *Crassostrea gigas* expostas à duas concentrações de cocaína em 24h de exposição. A sigla CT representa o grupo controle (água do mar + acetoneitrila 0,05%). As siglas E1 e E2 representam os grupos expostos à cocaína nas concentrações 0,5 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os dados estão apresentados na forma de média \pm desvio-padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) nos tratamentos em relação ao grupo controle.



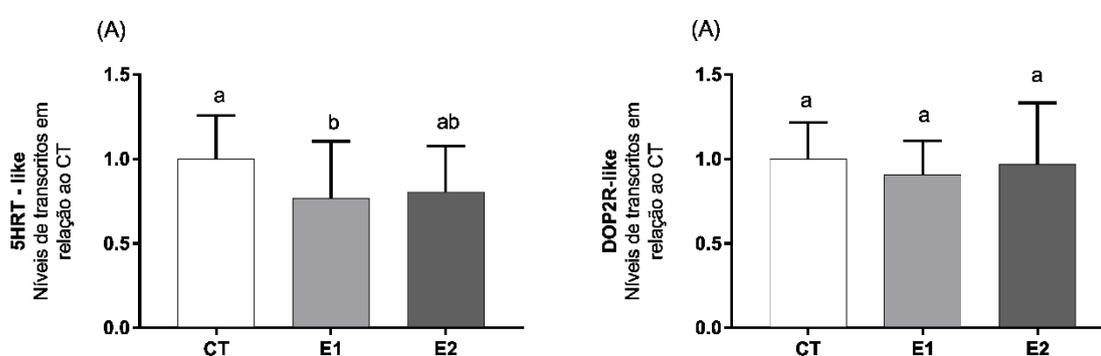
4.5.2 Respostas transcricionais de genes de neurotransmissão em brânquias de *C. gigas*

Os moluscos bivalves são organismos residentes das regiões intertidais e são frequentemente submetidos às flutuações em parâmetros ambientais como pH, temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido. Nesse cenário, as vias catecolaminérgicas (dopamina, norepinefrina e epinefrina) e serotoninérgicas são reconhecidas como respostas ao estresse altamente conservadas tanto em vertebrados e invertebrados (Chen et al., 2008).

Neste estudo não foram observadas alterações significativas nos transcritos de *DOP2R-like* (Fig. 2B). Por outro lado, ostras *C. gigas* expostas à 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de COC apresentaram níveis de transcrição de *5HRT-like* 1,3 vezes menores em relação ao controle (Fig. 2A). Esses

resultados são esperados, uma vez que a COC atua como bloqueador dos transportadores de monoaminas, como a serotonina, resultando no aumento da concentração destes neurotransmissores na fenda sináptica (Rasmussen et al., 2001), conforme observado por Fontes et al (2022) em mexilhões *P. perna* expostos a 0,2 e 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de COC durante 48h.

Figura 3. Níveis de transcritos dos genes (A) *5HRT-like* e (B) *DOP2R-like* em brânquias de ostras *Crassostrea gigas* expostas à duas concentrações de cocaína em 24h de exposição. A sigla CT representa o grupo controle (água do mar + acetoneitrila 0,05%). As siglas E1 e E2 representam os grupos expostos à cocaína nas concentrações 0,5 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os dados estão apresentados na forma de média \pm desvio-padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) nos tratamentos em relação ao grupo controle.



Serotonina (5-HT) é uma molécula-chave no sistema neuroendócrino serotoninérgico, sendo sintetizada pela enzima triptofano hidroxilase a partir do aminoácido essencial triptofano, (van Donkelaar et al., 2021). Esse neurotransmissor está envolvido na modulação de diversos processos fisiológicos em moluscos, incluindo controle da atividade locomotora-ciliar (Syed; Winlow, 1989, Lewis et al., 2011), reprodução (Matsutani; Nomura, 1987), resposta ao estresse (Dong et al., 201) e resposta imune (Jia et al., 2018), desenvolvimento (Panasophonkul et al., 2009) e controle do apetite e comportamento alimentar (Tierney et al., 2020). Neste sentido, alterações no sistema serotoninérgico, decorrentes da exposição à cocaína, podem implicar em impactos negativos nos diferentes processos fisiológicos citados.

A metamorfose de larvas planctônicas em juvenis é crucial no ciclo de vida de diversas espécies de moluscos, sendo uma etapa crítica na larvicultura de moluscos, associada a altas taxas de mortalidade (80 a 90%) (Joyce; Vogeler, 2018). Recentemente, Zhang et al. (2021) identificaram uma expressão diferencial nas vias serotoninérgicas em larvas pedivéliger e sementes de ostras perlíferas *Pinctada fucata martensii*. Em consonância ao nosso estudo, gastrópodes *Helisoma trivolvis* também apresentaram uma regulação negativa nos transcritos de 5-HT (5-HTR4 e 5-HRT7), durante a transição dos estágio pré-metamórfico para o estágio

metamórfico. Dessa forma, hipotetizamos que a exposição à COC também possa influenciar as respostas transcricionais de 5-HT, exercendo efeitos significativos na metamorfose em *C. gigas*.

Além do papel no desenvolvimento, a serotonina é reconhecida como um indutor da liberação de gametas em bivalves, enquanto que a dopamina atua como um inibidor da atividade serotoninérgica nesse processo (Fong et al., 1993). Matsutani & Nomura (1987) observaram uma indução na maturação dos gametas e desova em vieiras *Patinopecten yessoensis* em resposta a concentrações crescentes de 5-HT. Segundo o nosso conhecimento, estudos com foco na avaliação das alterações neuroendócrinas resultantes da exposição às drogas ilícitas (por exemplo, COC), em moluscos bivalves, são inexistentes na literatura. Neste sentido, hipotetizamos que os resultados observados em nosso estudo representem uma resposta inicial das ostras *C. gigas* em resposta à COC, implicando em possíveis efeitos de desregulação endócrina nos animais em um cenário de exposição crônica. O estudo conduzido por Gay et al (2013) reforçam essa hipótese, uma vez que foi observado desregulação endócrina em enguias *Anguilla anguilla* após 30 dias de exposição a cocaína (20 ng L⁻¹).

Conforme comentado anteriormente, a serotonina também atua na regulação do apetite e no comportamento alimentar em invertebrados (revisado por Tierney, 2020). Neste sentido, drogas psicoativas podem influenciar nesses processos. Felice et al (2022) observaram uma significativa redução no comportamento alimentar em lagostins *Procambarus clarkii* expostos à cocaína (50 e 500 ng L⁻¹), quando comparados ao grupo controle (Felice et al., 2022). Em moluscos bivalves, a captura de alimentos é mediada pelo batimento ciliar, um processo fisiológico vital que também viabiliza a natação em formas jovens. Larvas véliger de *M. edulis* expostas a concentrações mais elevadas de 5-HT apresentaram imobilidade e natação errática (Beiras; Widdows, 1995), evidenciando os efeitos da desregulação neuroendócrina nas desordens locomotoras em moluscos bivalves. Assim, sugerimos que alterações no sistema serotoninérgico, mediado pela COC, também possa afetar esses processos em *C. gigas*.

Por fim, nossos resultados sugerem que a cocaína pode atuar como desregulador do sistema serotoninérgico, implicando em alterações significativas em diversos processos fisiológicos em ostras do Pacífico. No entanto, investigações adicionais são necessárias para validar essa hipótese.

4.5.3 Respostas transcricionais e enzimáticas envolvidas no estresse oxidativo em brânquias de *C. gigas*

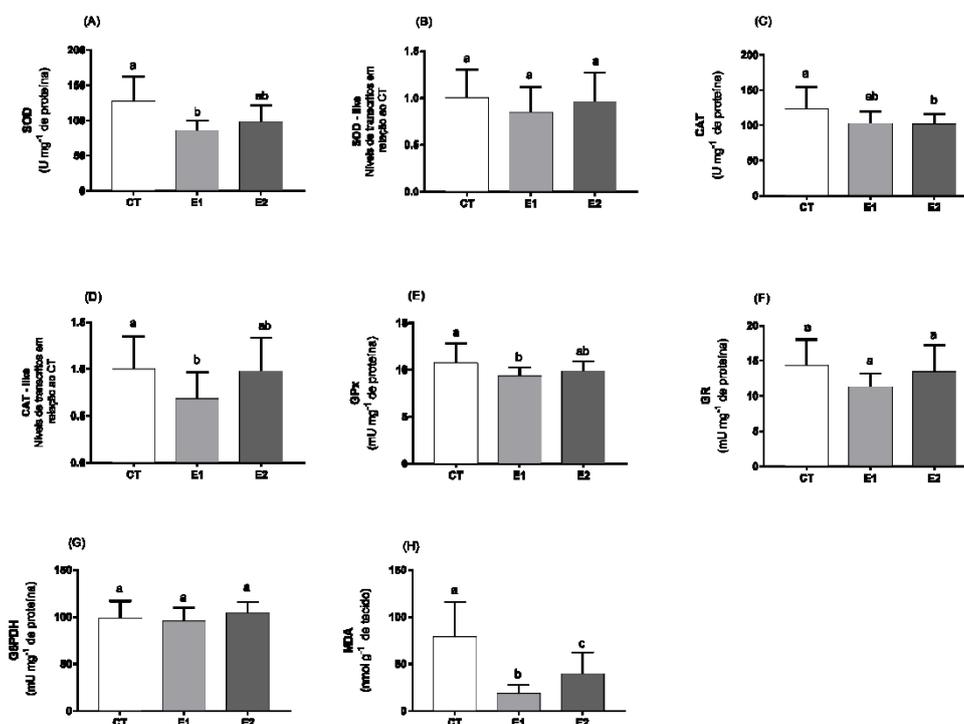
O consumo de cocaína está associado a diversos danos irreversíveis em seres humanos, afetando os sistemas cerebral, cardíaco, pulmonar, renal e hepático em humanos. Os mecanismos envolvidos na indução desses danos biológicos incluem superestimulação do sistema adrenérgico, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial no metabolismo de norcocaína ou hepatotoxicidade pela cocaína (Riezzo et al., 2012).

Em invertebrados, a quantificação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) é comumente utilizada para avaliar o estado oxidativo dos animais em resposta a condições pró-oxidantes resultantes da toxicidade de diferentes contaminantes antropogênicos, incluindo drogas ilícitas (Binelli et al., 2012, Parolini et al., 2013). Neste estudo não observamos alterações significativas na atividade das enzimas GR e G6PDH (Fig. 3F-G, respectivamente) e nos níveis de transcritos de SOD-like (Fig. 3B).

SOD representam a primeira linha de defesa antioxidante no organismo, desempenhando papel fundamental na proteção contra os danos oxidativos provocados pelo ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), convertendo-os em oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em nosso estudo, ostras *C. gigas* não apresentaram alterações significativas nos transcritos de *SOD-like* após 24h de exposição à COC (0,5 e 5 $\mu g L^{-1}$). No entanto, os animais expostos à menor concentração apresentaram uma significativa diminuição na atividade SOD (1,5 vezes) após 96h.

Esses resultados possivelmente estão relacionados a um mecanismo de feedback-negativo que regula a expressão de CYP450 em condições de superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs), conforme indicado pela transcrição das isoformas CYP1A-like e CYP356A1 neste estudo (Morel; Barouki, 1999). Resultados similares foram previamente descritos por Felice et al (2019) em *Daphnia magna* em resposta à exposição a 500 $ng L^{-1}$ de COC durante 7 e 21 dias.

Figura 4. Atividade das enzimas envolvidas na defesa antioxidante (SOD, CAT, GPx, GR, GPPDH) e marcadores de dano oxidativo (MDA) em brânquias de ostras *C. gigas* expostas à duas concentrações de cocaína durante 96 h. A sigla CT representa o grupo controle (água do mar + acetoneitrila 0,05%). As siglas E1 e E2 representam os grupos expostos à cocaína nas concentrações 0,5 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os dados estão apresentados na forma de média \pm desvio-padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) nos tratamentos em relação ao grupo controle.



CAT e GPx desempenham um papel concomitante para neutralizar a reatividade e a toxicidade do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), catalisando a reação de decomposição em H_2O e O_2 (Nandi et al., 2019). De forma semelhante a SOD, ostras *C. gigas* expostas à 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de COC também apresentaram uma regulação negativa (1,4 vezes) nos transcritos do gene *CAT-like* (Fig. 3D), enquanto alterações na atividade catalítica (diminuição em 1,2 vezes) foram observadas apenas nos animais expostos à 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de COC (Fig. 3C). Além disso, a atividade GPx em *C. gigas* foi negativamente regulada em resposta à menor concentração de COC neste estudo (Fig. 3A e 3C).

Esses resultados indicam que a exposição à COC promoveu um desbalanço no estado oxidativo em ostras *C. gigas* em ambas concentrações ambientais avaliadas neste estudo. Respostas não sincronizadas entre os níveis de transcrição e as atividades catalíticas, conforme observadas em SOD e CAT, são frequentemente relatadas em exposições em laboratório e podem estar associadas às diferenças temporais nos processos pós-transcricionais e de síntese proteica (Regoli; Giuliani, 2014).

Os moluscos bivalves têm a capacidade de acumular níveis significativos de glicogênio e ácidos graxos (saturados e PUFAs). Flutuações sazonais nos níveis dessas reservas energéticas entre ciclos de “estocagem” e utilização estão diretamente envolvidas em processos fisiológicos como disponibilidade de alimento (Gabbott, 1983, Dridi et al., 2007), desenvolvimento (García-Esquivel et al., 2001), reprodução (Bayne, 1976) e resposta ao estresse ambiental e por contaminantes químicos (Filimonova et al., 2016).

A cocaína pode influenciar o estado energético em humanos, interferindo na homeostase de lipídios e glicose (Nogueiras et al., 2010, Banke et al., 2013). Em moluscos bivalves, Fontes et al (2022) relataram um aumento no conteúdo total de lipídios em mexilhões *P. perna* após 48h e 169h de exposição à COC. Esse cenário pode favorecer danos oxidativos aos fosfolipídios insaturados, glicolipídios e colesterol, levando à formação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e causando diversos efeitos citopatológicos (Girotti, 1998).

A peroxidação lipídica é um marcador de dano oxidativo bem estabelecido em estudos ecotoxicológicos, representando os mecanismos de toxicidade de diversos estressores ambientais e químicos (Almeida et al., 2007), incluindo a cocaína (Teaf et al., 1984). Interessantemente, em nosso estudo observamos um significativo decréscimo nos níveis de peroxidação lipídica nas ostras *C. gigas* expostas à COC (0,5 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$) em relação ao grupo controle (Fig. 3H).

Os mecanismos de toxicidade da cocaína em moluscos bivalves marinhos ainda não estão completamente esclarecidos. Portanto, duas hipóteses são consideradas: 1) a participação do sistema antioxidante não-enzimático (como a GSH) na mitigação dos danos oxidativos resultantes da exposição à COC; 2) o envolvimento da 5-HT na modulação da resposta ao estresse oxidativo, conforme indicado por Dong et al (2017), que observaram menores níveis de H_2O_2 em *C. gigas* tratadas com 5-HT (10^{-5} mol^{-1}) e, posteriormente, expostas ao ar, associado ao aumento na atividade SOD na hemolinfa. Os autores também relataram maior predominância de 5-HT na hemolinfa e manto das ostras em relação aos demais tecidos, sugerindo uma possível resposta tecido-específica.

Em uma visão global dos nossos resultados, ostras *C. gigas* apresentaram respostas diferentes em relação a outras espécies de moluscos bivalves como mexilhões *D. polymorpha* (Parolini et al., 2015), *Mytilus galloprovincialis* (Felice; Parolini, 2020), *P. perna* (Ortega et al., 2018), onde foi observada uma modulação positiva das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) e o aumento nos níveis de peroxidação lipídica. Essas discrepâncias nos biomarcadores sugerem respostas espécie-específicas em moluscos bivalves diante da exposição à cocaína.

4.6 Conclusão

As respostas dos biomarcadores indicam que ambas concentrações ambientais de cocaína avaliadas neste estudo podem alterar os sistemas de biotransformação de fase I (*CYP1A-like*, *CYP356A1-like* e *CbE5A-like*) e defesa antioxidante (SOD, CAT, *CAT-like* e GPx) em ostras *Crassostrea gigas*. Além disso, a cocaína pode desregular o sistema serotoninérgico (evidenciado pela regulação negativa nos transcritos de *5HT-like*), alertando para possíveis impactos na reprodução e metamorfose em ostras do Pacífico. Por fim, nossos resultados evidenciam a necessidade de estudos adicionais para avaliar possíveis respostas espécie-específicas e tecido-específicas entre moluscos bivalves.

4.7 Referências

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, p.121-126.
- Almeida, E. A. et al. 2007. 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.
- Almeida, A. et al. 2018. Effects of carbamazepine and cetirizine under an ocean acidification scenario on the biochemical and transcriptome responses of the clam *Ruditapes philippinarum*. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 857-868.
- Arinç, E; Bozcaarmutlu, A. 2003. Catalyzation of cocaine N-demethylation by cytochromes P4502B, P4503A, and P4502D in fish liver. **Journal Of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 17, n. 3, p. 169-176.
- Banke, E. et al. 2013. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript is expressed in adipocytes and regulate lipid- and glucose homeostasis. **Regulatory Peptides**, v. 182, p. 35-40.
- Bayne, B.L.1976. Aspects of reproduction in bivalve molluscs. **Estuarine Processes**, p. 432-448.
- Beiras, R.; Widdows, J. 1995. Effect of the neurotransmitters dopamine, serotonin and norepinephrine on the ciliary activity of mussel (*Mytilus edulis*) larvae. **Marine Biology**, v. 122, n. 4, p. 597-603.
- Bourioug, M. et al. 2018. Assessment of *Lemna minor* (duckweed) and *Corbicula fluminea* (freshwater clam) as potential indicators of contaminated aquatic ecosystems: responses to presence of psychoactive drugs mixture. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 11192-11204.

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

Bravo, R. R. et al. 2022. Cocaine: an updated overview on chemistry, detection, biokinetics, and pharmacotoxicological aspects including abuse pattern. **Toxins**, v. 14, n. 4, p. 278.

Carlberg, I.; Mannervik, B. 1985. Glutathione reductase. **Glutamate, Glutamine, Glutathione, and Related Compounds**, p. 484-490.

Carter, L. J. et al. 2022. Predicting the Accumulation of Ionizable Pharmaceuticals and Personal Care Products in Aquatic and Terrestrial Organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, p. 1-11.

Chen, M. et al. 2008. Catecholaminergic responses to environmental stress in in the hemolymph of Zhikong scallop *Chlamys farreri*. **Jez-A Ecological and Integrative Physiology**, v. 309, p. 289-296.

Davey, C. J. E. et al. 2022. Occurrence, hazard, and risk of psychopharmaceuticals and illicit drugs in European surface waters. **Water Research**, v. 222, p. 118878.

Dridi, S. et al. 2007. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. **Aquaculture**, v. 263, n. 1-4, p. 238-248.

Dong, W. et al. 2017. The modulation role of serotonin in Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to air exposure. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 62, p. 341-348.

Felice, B. et al. 2019. Biochemical and behavioral effects induced by cocaine exposure to *Daphnia magna*. **Science Of The Total Environment**, v. 689, p. 141-148.

Felice, B.; Parolini, M. 2020. Effects of single and combined exposure to cocaine and benzoylecgonine on the oxidative status of *Mytilus galloprovincialis*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 80, p. 103475.

Filimonova, V. et al. 2016. Fatty acid profiling as bioindicator of chemical stress in marine organisms: a review. **Ecological Indicators**, v. 67, p. 657-672.

Fiorito, F. et al. 2021. Oyster *Crassostrea gigas*, a good model for correlating viral and chemical contamination in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 172, p. 112825.

Fontes, M. K. et al. 2019. Seasonal monitoring of cocaine and benzoylecgonine in a subtropical coastal zone (Santos Bay, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 149, p. 110545.

Fontes, M. K. et al. 2020. Review on the Occurrence and biological effects of illicit drugs in aquatic ecosystems. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 30998-31034.

- Fong, P. P. et al. 1993. Dopamine reduces intensity of serotonin-induced spawning in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). **Journal Of Experimental Zoology**, v. 266, n. 1, p. 79-83.
- Gabbott, P. A. 1983. Developmental and Seasonal Metabolic Activities in Marine Molluscs. **The Mollusca**, p. 165-217, 1983.
- García-Esquivel, Z. et al. 2001. Physiological basis for energy demands and early postlarval mortality in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Journal Of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 263, n. 1, p. 77-103.
- Gay, F. et al. 2013. Endocrine Disruption in the European Eel, *Anguilla anguilla*, Exposed to an Environmental Cocaine Concentration. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 224, n. 5.
- Girotti, A.W. 1988. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. **Journal Of Lipid Research**, v. 39, n. 8, p. 1529-1542.
- Glebov, K. et al. 2014. Mechanisms underlying dual effects of serotonin during development of *Helisoma trivolvis* (Mollusca). **BMC Developmental Biology**, v. 14, 14p.
- Glock, G. E.; Mclean, P. 1953. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochemical Journal**, v. 55, n. 3, p. 400-408.
- Guengerich, 2008. Cytochrome P450 and chemical toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, pp. 70-83.
- Inaba, T. 1989. Cocaine: pharmacokinetics and biotransformation in man. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 67, n. 9, p. 1154-1157.
- Jia, Y. et al. 2018. A serotonin receptor (Cg5-HTR-1) mediating immune response in oyster *Crassostrea gigas*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 82, p. 83-93.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183-6188.
- Lewis et al., 2011. Serotonin influences locomotion in the nudibranch mollusc *Melibe leonina*. **The Biological Bulletin**, v. 220, p. 155-160.
- Marcantonio, C. et al. 2023. A step forward on site-specific environmental risk assessment and insight into the main influencing factors of CECs removal from wastewater. **Journal Of Environmental Management**, v. 325, p. 116541.
- Matsutani, T.; Nomura, T. 1987. In vitro effects of serotonin and prostaglandins on release of eggs from the ovary of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 67, n. 1, p. 111-118.
- McCord, J. M.; Fridovich, I. 1969. Superoxide Dismutase. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055.

- Morel, Y.; Barouki, R. 1998. Down-regulation of Cytochrome P450 1A1 Gene Promoter by Oxidative Stress. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 273, n. 41, p. 26969-26976.
- Morel, Y.; Barouki, R. 1999. Repression of gene expression by oxidative stress. **Biochemical Journal**, v. 342, n. 3, p. 481-496.
- Nandi, A. et al. 2019. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1-19.
- Nogueiras, R. et al. 2010. Regulation of lipid metabolism by energy availability: a role for the central nervous system. **Obesity Reviews**, v. 11, n. 3, p. 185-201.
- Ortega, A. et al. 2018. Detoxification, oxidative stress, and cytogenotoxicity of crack cocaine in the brown mussel *Perna perna*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 27569-27578.
- Otero, S.; Kristoff, G. 2016. In vitro and in vivo studies of cholinesterases and carboxylesterases in *Planorbarius corneus* exposed to a phosphorodithioate insecticide: finding the most sensitive combination of enzymes, substrates, tissues and recovery capacity. **Aquatic Toxicology**, v. 180, p. 186-195.
- Panasophonkul, S. et al. 2009. Molecular characterization and analysis of a truncated serotonin receptor gene expressed in neural and reproductive tissues of abalone. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 131, n. 5, p. 629-642.
- Parolini, M. et al. 2013. Sub-lethal effects caused by the cocaine metabolite benzoylecgonine to the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. **Science Of The Total Environment**, v. 444, p. 43-50.
- Parolini, M. et al. 2015. Realistic mixture of illicit drugs impaired the oxidative status of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). **Chemosphere**, v. 128, p. 96-102.
- Pereira, C. D. S. et al. 2016. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. **Science Of The Total Environment**, v. 548-549, p. 148-154.
- Pereira, C. D. S. et al. 2016. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. **Science Of The Total Environment**, v. 548-549.
- Pisetta, A. et al. 2022. First report on the occurrence of pharmaceuticals and cocaine in the coastal waters of Santa Catarina, Brazil, and its related ecological risk assessment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 42, p. 63099-63111.
- Pisoschi, A. M.; Pop, A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74.
- Rasmussen, S. G.F. et al. 2001. Biophysical Characterization of the Cocaine Binding Pocket in the Serotonin Transporter Using a Fluorescent Cocaine Analogue as a Molecular Reporter. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 276, n. 7, p. 4717-4723.

Riezzo, I. et al. 2012. Side Effects of Cocaine Abuse: multiorgan toxicity and pathological consequences. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 33, p. 5624-5646.

Rhinn, H. et al. 2008. One-step quantification of single-stranded DNA in the presence of RNA using Oligreen in a real-time polymerase chain reaction thermocycler. **Analytical Biochemistry**, v. 372, n. 1, p. 116-118.

Roveri, V. et al. 2021. Occurrence and risk assessment of pharmaceuticals and cocaine around the coastal submarine sewage outfall in Guarujá, São Paulo State, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 11384-11400.

Schmittgen, T., Livak, K. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. **Nature Protocols**, v. 3, p. 1101–1108.

Siebert, M. N. et al. 2017. Characterization of ethoxyresorufin O-deethylase activity (EROD) in oyster *Crassostrea brasiliana*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 203, p. 115-121.

Solé, M.; Freitas, R.; Rivera-Ingraham, G. 2021. The use of an in vitro approach to assess marine invertebrate carboxylesterase responses to chemicals of environmental concern. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 82, p. 103561.

Syed, N.I.; Winlow, W. 1989. Morphology and electrophysiology of neurons innervating the ciliated locomotor epithelium in *Lymnaea stagnalis* (L.). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 93, n. 3, p. 633-644.

Teaf, C. M. et al. 1984. Cocaine-Induced Hepatotoxicity: lipid peroxidation as a possible mechanism. **Drug And Chemical Toxicology**, v. 7, n. 4, p. 383-396.

Tierney, A. J. 2020. Feeding, hunger, satiety and serotonin in invertebrates. **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 287, n. 1932.

Thomas, K.V. et al. 2014. Screening for Selected Human Pharmaceuticals and Cocaine in the Urban Streams of Manaus, Amazonas, Brazil. **Jawra Journal of The American Water Resources Association**, v. 50, n. 2, p. 302-308.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC) (2022). **World Drug Report 2022**. United Nations Publication, Sales n. Disponível em: <https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/world-drug-report-2022.html>. Acesso em 10/10/2023.

van Donkelaar, E L. et al. 2011. Mechanism of acute tryptophan depletion: is it only serotonin? **Molecular Psychiatry**, v. 16, n. 7, p. 695-713.

Watanabe, K. et al. 2020. Occurrence of Stimulant Drugs of Abuse in a San Diego, CA, Stream and their Consumption Rates in the Neighboring Community. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, 202.

Wendel, A. 1981. Glutathione peroxidase. **Methods In Enzymology**, p. 325-333.

Zhang, J. et al. 2021. Integrated application of transcriptomics and metabolomics provides insights into the larval metamorphosis of pearl oyster (*Pinctada fucata martensii*). **Aquaculture**, v. 532, p. 736067.

Zhao, J. et al. 2022. Illicit drugs and their metabolites in urban wastewater: analysis, occurrence and consumption in Xinjiang, China. **Science Of The Total Environment**, v. 852, p. 158457.

CAPÍTULO V

5.1. Considerações finais

Os resultados gerados no **capítulo 2** desta tese demonstraram que as áreas de cultivo de ostras *Crassostrea gigas* na Grande Florianópolis são impactadas por esgoto sanitário. Dentre os locais monitorados, apenas as ostras coletadas na Caieira apresentaram níveis de coliformes termotolerantes dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira. Os níveis de HPAs foram detectados em todos os pontos, sendo mais prevalentes em Imaruí e Serraria. De acordo com estudos prévios na literatura, as áreas de cultivo de ostras em Florianópolis apresentam baixa contaminação por HPAs. No entanto, a indução de genes envolvidos na fase I e II (*CYP1A-like*, *CYP356A1-like*, *CYP2A1-like*, *CYP2-like*, *GSTO.4A-like*) de biotransformação e defesa antioxidante (*SOD-like* e *CAT-like*) em ostras coletadas em Imaruim e Serraria está associada à maior ocorrência de HPAs nestes locais, sugerindo uma resposta às condições pró-oxidantes resultantes da poluição em áreas de cultivo na Grande Florianópolis. Com base nesses resultados, sugerimos que ações como a depuração de moluscos bivalves podem ser adotadas em áreas de cultivo da Grande Florianópolis, especialmente naquelas localizadas na região continental das baías, a fim de garantir a inocuidade e qualidade desses moluscos bivalves destinados ao consumo humano. Recentemente, escopo de contaminantes a serem analisados pelo Programa MoluBiS (antigo PNCMB) foi ampliado adicionando o monitoramento de HPAs. Neste contexto, os resultados gerados neste estudo podem servir como baseline, auxiliando na comparação dos resultados entre diferentes localidades.

Os resultados gerados no **capítulo 3** desta tese demonstraram a diversidade de contaminantes antropogênicos em áreas costeiras de Santa Catarina. Neste estudo foram detectados os níveis de 75 compostos, incluindo antibióticos, desreguladores endócrinos, anti-inflamatórios não-esteroidais, HPAs, PCBs e pesticidas em ostras nativas *Crassostrea gasar*. Os contaminantes emergentes foram quantificados em todas as áreas, sendo mais prevalentes nas regiões centro-sul do estado. Por outro lado, as concentrações mais elevadas de POPs foram encontradas nas regiões centro-norte do litoral. Esses resultados evidenciam a precarização do saneamento básico em Santa Catarina. As ostras *C. gasar* apresentaram uma indução nos sistemas de biotransformação e defesa antioxidante nos locais mais poluídos. Observamos uma possível influência dos parâmetros ambientais nas respostas dos biomarcadores. Neste sentido, consideramos duas hipóteses: 1) Associação das respostas aos processos fisiológicos de resposta ao estresse ambiental, 2) Influência dos parâmetros ambientais (por exemplo, pH) na biodisponibilização dos compostos ionizáveis (AINEs). Neste contexto, sugerimos que monitoramentos sazonais e periódicos devem ser realizados nestas áreas para investigar a

contribuição dessas variáveis ambientais nas respostas biológicas e na bioacumulação de contaminantes emergentes, como os antibióticos e AINEs. O gene *CYP356A1-like* apresentou significativa responsividade em LG-A, ponto onde detectamos maior ocorrência AINEs e desreguladores endócrinos, sugerindo o uso dessa isoforma como potencial biomarcador para compostos farmacêuticos. Os animais coletados em Florianópolis apresentaram maior susceptibilidade à peroxidação lipídica, em relação às demais regiões de monitoramento, alertando para os possíveis impactos negativos da poluição aquática sobre o cultivo de moluscos bivalves nesta região. Com base nos nossos resultados, acreditamos que estudos adicionais de modelagem hidrodinâmica devem ser realizados para investigar a dispersão desses contaminantes nos ambientes costeiros, possibilitando o mapeamento de áreas críticas.

Por fim, os resultados gerados no **capítulo 4** desta tese demonstraram que as concentrações ambientais de cocaína geraram alterações moleculares e bioquímicas nas ostras do Pacífico. Os genes envolvidos na via do citocromo P450 (*CYP1A-like* e *CYP356A1-like*) foram negativamente transcritos em ambas concentrações avaliadas, possivelmente indicando um processo de autoregulação em resposta ao aumento de EROs. Em relação à carboxilesterase, observamos uma indução nos transcritos de *CbE5A-like* em resposta a ambas concentrações de cocaína. As ostras *C. gigas* apresentaram também uma regulação negativa nos transcritos de *5HT-like*, sugerindo potenciais efeitos em diferentes processos fisiológicos regulados pelo sistema serotoninérgico. Neste estudo não foram observadas alterações significativas na atividade GST. No entanto, respostas diferenciais entre isoformas GST são bem documentadas na literatura e sugerem investigações adicionais. Similarmente aos biomarcadores moleculares, as enzimas de defesa antioxidante SOD, CAT e GPx apresentaram significativa diminuição em ostras expostas. No entanto, não foi observado um aumento nos níveis de peroxidação lipídica. Por fim, sugerimos que investigações adicionais devem ser realizadas para avaliar os efeitos da cocaína na modulação do sistema serotoninérgico e em vias metabólicas associadas em *C. gigas*, incluindo reprodução, metamorfose e resposta ao estresse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- AGUIRRE-RUBÍ, J. et al. 2018. Assessment of ecosystem health disturbance in mangrove-lined Caribbean coastal systems using the oyster *Crassostrea rhizophorae* as sentinel species. **Science Of The Total Environment**, v. 618, p. 718-735. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.098>
- ALMEIDA, E. A. et al. 2007. 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.040>
- AQUILINA-BECK, A. et al. 2023. Employing molecular, chemical and physiological techniques using *Crassostrea virginica* to assess ecosystem health along coastal South Carolina and North Carolina, United States. **Environmental Research**, v. 236, p. 116817. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2023.116817>
- BARD, S. 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 48, n. 4, p. 357-389. [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-445x\(00\)00088-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-445x(00)00088-6)
- BANNI, M. et al. 2015. Molecular and Cellular Effects Induced in *Mytilus galloprovincialis* Treated with Oxytetracycline at Different Temperatures. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. 0128468. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0128468>.
- BASTOLLA, C. L.V. et al. 2022. Molecular changes in oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) from aquaculture areas of Santa Catarina Island bays (Florianópolis, Brazil) reveal anthropogenic effects. **Chemosphere**, v. 307, p. 135735. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135735>.
- BEEBY, A. 2001. What do sentinels stand for? **Environmental Pollution**, v. 112, n. 2, p. 285-298. [http://dx.doi.org/10.1016/s0269-7491\(00\)00038-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0269-7491(00)00038-5)
- BOSCH-OREA, C. et al. 2023. Integrated analysis of marine biotoxins and contaminants of emerging concern in bivalve mollusks from Santa Catarina, Brazil. **Science Of The Total Environment**, v. 905, p. 167254. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167254>.
- BOUTET, I. et al. 2004. Characterisation and expression of four mRNA sequences encoding glutathione S-transferases pi, mu, omega and sigma classes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides. **Marine Biology**, v. 146, 53–64. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1423-6>
- BRIAND, M. J. et al. 2023. The French Mussel Watch: more than two decades of chemical contamination survey in mediterranean coastal waters. **Marine Pollution Bulletin**, v. 191, p. 114901. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114901>
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. **Aprova o Regulamento Técnico e Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos**. https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/1998/anexo/anexo_prt0685_27_08_1998.pdf

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Ministério da Pesca e Aquicultura. Instrução normativa nº 7, de 08 de maio de 2012. **Institui o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB), estabelece os procedimentos para a sua execução e dá outras providências.** Brasília, DF.

<http://www.ibama.gov.br/component/legislacao/?view=legislacao&legislacao=127136>

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Resolução RDC nº42, de 29 de agosto de 2013. **Dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos.** Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 30 ago. 2013.

http://bvsm.sau.gov.br/bvs/sau/legis/anvisa/2013/rdc0042_29_08_2013.pdf

CAJARAVILLE, M. et al. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science Of The Total Environment**, v. 247, n. 2-3, p. 295-311. [http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00499-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00499-4).

CAPPARELLI, M. V. et al. 2023. Multi-level responses of oysters *Crassostrea virginica* for assessing organochlorine pesticides in a Ramsar coastal lagoon in southern Mexico. **Chemosphere**, v. 320, p. 138064. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138064>.

CAPOLUPO, M. et al. 2018. The impact of propranolol, 17 α -ethinylestradiol and gemfibrozil on early life stages of marine organisms: effects and risk assessment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 32196-32209. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3185-6>

CARMO, S.N. et al. 2020. Determination of pesticides of different chemical classes in drinking water of the state of Santa Catarina (Brazil) using solid-phase microextraction coupled to chromatographic determinations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 43870-43883. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10287-0>

CHAHOURI, A. 2023. Bivalve molluscs as bioindicators of multiple stressors in the marine environment: recent advances. **Continental Shelf Research**, v. 264, p. 105056. <http://dx.doi.org/10.1016/j.csr.2023.105056>

CHO, Y. et al. 2021. Nationwide monitoring of microplastics in bivalves from the coastal environment of Korea. **Environmental Pollution**, v. 270, p. 116175. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116175>.

CHOI, H. G. et al. 2009. Mussel watch program for organic contaminants along the Korean coast, 2001–2007. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 169, n. 1-4, p. 473-485. <http://dx.doi.org/10.1007/s10661-009-1190-4>.

CONAMA nº 357. Conselho Nacional de Meio Ambiente - Resolução Nº 357/2005 Dispõe sobre a Classificação dos Corpos Hídricos e Diretrizes Ambientais para sua Classificação, bem como Estabelece as Condições e Padrões para o Descarte de Efluentes, e dá outras providências (2005).

COSTA, G. K. A. et al. 2023. Concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and histological changes in *Anomalocardia brasiliana* and *Crassostrea rhizophorae* from

Pernambuco, Brazil after the 2019 oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, v. 192, p. 115066. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115066>.

COSTELLO, C. et al. 2020. The future of food from the sea. **Nature**, v. 588, p. 95–100. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2616-y>

EHRHART, A. L.; GRANЕК, E. F. 2021. Pharmaceuticals and alkylphenols in transplanted Pacific oysters (*Crassostrea gigas*): spatial variation and growth effects. **Marine Pollution Bulletin**, v. 170, p. 112584. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112584>.

EHRHART, A. L.; GRANЕК, E. F. 2023. PPCPs in coastal wastewater treatment plant effluent and uptake by Pacific oysters (*Crassostrea gigas*): findings from a laboratory experiment. **Science Of The Total Environment**, v. 900, p. 165728. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165728>.

EWERE, E. E. et al. 2020. The neonicotinoid insecticide imidacloprid, but not salinity, impacts the immune system of Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. **Science Of The Total Environment**, v. 742, p. 140538. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140538>

FAO. Food and Agriculture Organization of the United States. 2022. **The state of world fisheries and aquaculture: Towards blue transformation**, v. 1, 266p. Rome. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>

FARRINGTON, J. W. 2016. Edward D. Goldberg's proposal of “the Mussel Watch”: reflections after 40 years. **Marine Pollution Bulletin**, v. 110, n. 1, p. 501-510.

FERRARO, A. et al. 2023. Characterising contaminants distribution in marine-coastal sediments through multivariate and nonparametric statistical analyses: a complementary strategy supporting environmental monitoring and control. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 195, n. 59. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10617-4>

FERREIRA, C. P. et al. 2019. Metal bioaccumulation, oxidative stress and antioxidant responses in oysters *Crassostrea gasar* transplanted to an estuary in southern Brazil. **Science Of The Total Environment**, v. 685, p. 332-344. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.384>.

FERREIRA, C. P. et al. 2021. Integrated biomarker responses in oysters *Crassostrea gasar* as an approach for assessing aquatic pollution of a Brazilian estuary. **Marine Environmental Research**, v. 165, p. 105252. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2021.105252>.

FIORITO, F. et al. 2019. A relationship between environmental pollutants and enteric viruses in mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **Environmental Research**, v. 169, p. 156-162. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.001>.

FIORITO, F. et al. 2021. Oyster *Crassostrea gigas*, a good model for correlating viral and chemical contamination in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 172, p. 112825. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112825>.

- FONTANA, I. et al. 2020. A sampling plan for phycotoxins surveillance in bivalve mollusc farms along the Santa Catarina coast, Brazil. **Aquaculture**, v. 518, p. 734732. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734732>.
- FONTES, M. K. et al. 2018. A tiered approach to assess effects of diclofenac on the brown mussel *Perna perna*: a contribution to characterize the hazard. **Water Research**, v. 132, p. 361-370. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.077>.
- FONTES, M. K. et al. 2022. Environmentally realistic concentrations of cocaine in seawater disturbed neuroendocrine parameters and energy status in the marine mussel *Perna perna*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 251. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109198>.
- GALLOWAY, T. S. et al. 2002. Rapid assessment of organophosphorous/carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 61, n. 3-4, p. 169-180. [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-445x\(02\)00051-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-445x(02)00051-6)
- GERBA, C.P. 2019. Environmental Toxicology. **Environmental and Pollution Science**, p. 511-540. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-814719-1.00028-8>.
- GRAY, J. S. 2002. Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, n. 1-12, p. 46-52 [http://dx.doi.org/10.1016/s0025-326x\(01\)00323-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0025-326x(01)00323-x)
- GUENGERICH, 2008. Cytochrome P450 and chemical toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, pp. 70-83.
- HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M., 2015. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press.
- JANCOVA et al, 2010. Phase II Drug Metabolizing Enzymes. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky**. vol. 154 (2010), pp. 103-116.
- KELLER, R. et al. 2019. Surveillance of Enteric Viruses and Thermotolerant Coliforms in Surface Water and Bivalves from a Mangrove Estuary in Southeastern Brazil. **Food And Environmental Virology**, v. 11, n. 3, p. 288-296. <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-019-09391-3>.
- KING, M. D. et al. 2023. Polycyclic aromatic compound and trace metal element residues in *Mytilus* mussels at marine wildlife hotspots on the Pacific coast of Canada. **Environmental Pollution**, v. 316, p. 120624. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120624>
- KUMARI, K.; KHARE, A. 2017. Integration of Biomarker Approach in Pollution Monitoring Programme of Aquatic Ecosystem. **Biosynthetic Technology and Environmental Challenges**, p. 331-354. http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-7434-9_18
- LEREBOURS, A. et al. 2023. Seasonal variations of low pesticides contamination and biomarker responses in marine bivalves from French estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, v. 192, p. 114988. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114988>

- LEUNG, H. M. et al. 2022 Evaluating seasonal variations of fecal coliform colonization in *Magallana hongkongensis* and *Crassostrea rhizophorae*: a preliminary study of oyster quality grown in Hong Kong aquacultural farms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 178, p. 113583. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113583>.
- LEWIS, S., MASLIN, M. 2015. Defining the Anthropocene. **Nature**, v. 519, p. 171–180. <https://doi.org/10.1038/nature14258>
- LÜCHMANN, K. H. et al. 2014. A light in the darkness: new biotransformation genes, antioxidant parameters and tissue-specific responses in oysters exposed to phenanthrene. **Aquatic Toxicology**, v. 152, p. 324-334. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.04.021>
- LUSHCHAK, V. I. 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164-175. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>.
- MARCO, G. et al. 2022. Comparison of cellular mechanisms induced by pharmaceutical exposure to caffeine and its combination with salicylic acid in mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 93, p. 103888. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2022.103888>
- MELWANI, A. R. et al. 2014. Mussel watch update: long-term trends in selected contaminants from coastal California, 1977-2010. **Marine Pollution Bulletin**, v. 81, n. 2, p. 291-302. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.04.025>
- MIĆOVIĆ, V. et al. 2009. Metallothioneins and heat shock proteins 70 in marine mussels as sensors of environmental pollution in Northern Adriatic Sea. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 439-447. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2009.08.005>
- MLADINICH, K. et al. 2023. The relationship between microplastics in eastern oysters (*Crassostrea virginica*) and surrounding environmental compartments in Long Island Sound. **Marine Environmental Research**, v. 189, p. 106040. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2023.106040>
- MONCALEANO-NIÑO, A. M. et al. 2021. Monitoring metallothionein-like protein concentrations and cholinesterase activity in tropical cup oysters as biomarkers of exposure to metals and pesticides in the southern Caribbean, Colombia. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 17, p. 25157-25183. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-021-17644-7>
- MORTARI, A. et al. 2022. Norovirus and rotavirus in surface, malacoculture, and human consumption water in Santa Catarina State, Brazil. **Journal Of Water and Health**, v. 21, n. 1, p. 35-46. <http://dx.doi.org/10.2166/wh.2022.188>.
- MOTTIER, A. et al. 2023. Graphene oxide worsens copper-mediated embryo-larval toxicity in the pacific oyster while reduced graphene oxide mitigates the effects. **Chemosphere**, v. 335, p. 139140. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139140>

- NOBRE, C. R. et al. 2020. Effects of Microplastics Associated with Triclosan on the Oyster *Crassostrea brasiliana*: an integrated biomarker approach. **Archives Of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 79, n. 1, p. 101-110, <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-020-00729-8>
- NOGUEIRA, D. J. et al. 2017. Effects of phenanthrene on early development of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1789). **Aquatic Toxicology**, v. 191, p. 50-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.07.022>
- OOST, R. V. D.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p.57-149.
- PAROLINI, M. et al. 2016. Genotoxic effects induced by the exposure to an environmental mixture of illicit drugs to the zebra mussel. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 132, p. 26-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.05.022>.
- PISETTA, A.M. et al. 2022. First report on the occurrence of pharmaceuticals and cocaine in the coastal waters of Santa Catarina, Brazil, and its related ecological risk assessment. **Environmental Science And Pollution Research**, v. 29, n. 42, p. 63099-63111. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20312-z>
- PeixeBR, 2022. **Anuário Peixe BR da Piscicultura**. Associação Brasileira da Piscicultura, São Paulo (2022), p.1. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario2022/>
- REGOLI, F.; GIULIANI, M. E. 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. **Marine Environmental Research**, v. 93, p. 106-117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.07.006>.
- RENAULT, T. 2015. Immunotoxicological effects of environmental contaminants on marine bivalves. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 46, n. 1, p. 88-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.04.011>
- SALDAÑA-SERRANO, M. et al. 2022. Microplastics and linear alkylbenzene levels in oysters *Crassostrea gigas* driven by sewage contamination at an important aquaculture area of Brazil. **Chemosphere**, v. 307, p. 136039. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136039>.
- SANTA CATARINA. 2022. Secretaria de estado do desenvolvimento econômico sustentável. **Boletim de indicadores econômico-fiscais**. Disponível em: <https://www.sde.sc.gov.br/index.php/biblioteca/boletim>
- SANTOS, L.L. et al. 2020. PCBs occurrence in marine bivalves and fish from Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 154, p. 111070. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111070>.
- SANTA CATARINA. 2023. Agência Catarinense de Notícias. **Macroalgas: Epagri cria novo mercado para maricultores catarinenses**. Disponível em: <https://estado.sc.gov.br/noticias/macroalgas-epagri-cria-novo-mercado-para-maricultores-catarinenses-2/>

SANTOS-ECHEANDÍA, J. et al. 2021. The influence of natural vs anthropogenic factors on trace metal(loid) levels in the Mussel Watch Programme: two decades of monitoring in the Spanish mediterranean sea. **Marine Environmental Research**, v. 169, p. 105382. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2021.105382>.

SIDDIG, A. A.H. et al. 2016. How do ecologists select and use indicator species to monitor ecological change? Insights from 14 years of publication in Ecological Indicators. **Ecological Indicators**, v. 60, p. 223-230. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.06.036>

SIEBERT, M. N. et al. 2017a. Candidate cytochrome P450 genes for ethoxyresorufin O-deethylase activity in oyster *Crassostrea gigas*. **Aquatic Toxicology**, v. 189, p. 142-149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.004>

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

SIES, H. et al. 2017. Oxidative Stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 715-748. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>

SPARKS, C. et al. 2014. An analysis of historical Mussel Watch Programme data from the west coast of the Cape Peninsula, Cape Town. **Marine Pollution Bulletin**, v. 87, n. 1-2, p. 374-380. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.07.047>

SOLÉ, M. et al. 2018. The use of carboxylesterases as biomarkers of pesticide exposure in bivalves: a methodological approach. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 212, p. 18-24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.06.002>

SOUZA, R. V. et al. 2017. A critical analysis of the international legal framework regulating the microbiological classification of bivalve shellfish production areas. **Reviews In Aquaculture**, v. 10, n. 4, p. 1025-1033. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12222>.

SUPLICY, F. M. et al. 2015. Planning and management for sustainable coastal aquaculture development in Santa Catarina State, south Brazil. **Reviews In Aquaculture**, v. 9, n. 2, p. 107-124. <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12107>.

ŚWIACKA, K. et al. 2021. Toxic effects of NSAIDs in non-target species: a review from the perspective of the aquatic environment. **Environmental Pollution**, v. 273, p. 115891. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115891>

TALLEY, T. S. et al. 2022. Contaminant concentrations and risks associated with the Pacific oyster in the highly urbanized San Diego Bay. **Marine Pollution Bulletin**, v. 174, p. 113132. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.113132>

TRAN, T. K. A. et al. 2019. The utility of vitellogenin as a biomarker of estrogenic endocrine disrupting chemicals in molluscs. **Environmental Pollution**, v. 248, p. 1067-1078. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.056>

TROELL, M. et al. 2023. Perspectives on aquaculture's contribution to the Sustainable Development Goals for improved human and planetary health. **Journal Of The World Aquaculture Society**, v. 54, n. 2, p. 251-342. <http://dx.doi.org/10.1111/jwas.12946>

UEKI, Y. et al. 2021. Human norovirus disease burden of consuming *Crassostrea gigas* oysters: a case-study from Japan. **Food Control**, v. 121, p. 107556. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107556>.

UKWO, S. P. et al. 2023. Polychlorinated biphenyls residues in bivalve shellfish from Niger Delta: distribution pattern, tissue burden and food safety assessment. **Food Additives & Contaminants: Part B**, p. 1-10. <http://dx.doi.org/10.1080/19393210.2023.2233011>.

UNITED NATIONS. 2022. Department of Economic and Social Affairs, Population Division. **World Population Prospects 2022**. Data Sources (UN DESA/POP/2022/DC/n°9). Disponível em: <https://population.un.org/wpp/>. Acesso em outubro/2023.

VALENTI, W. C. et al. 2021. Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, v. 19, p. 100611, mar. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100611>

VODIASOVA, E.A. et al. 2021. Identification and characterization of the novel genes encoding glutathione S-transferases in *Mytilus galloprovincialis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 40, p. 100926. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbd.2021.100926>.

YANG, Y. et al. 2020a. Benzo[a]pyrene exposure induced reproductive endocrine-disrupting effects via the steroidogenic pathway and estrogen signaling pathway in female scallop *Chlamys farreri*. **Science Of The Total Environment**, v. 726, p. 138585. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138585>.

YANG, Y. et al. 2020. Benzo[a]pyrene exposure disrupts steroidogenesis and impairs spermatogenesis in diverse reproductive stages of male scallop (*Chlamys farreri*). **Environmental Research**, v. 191, p. 110125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2020.110125>.

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

ZHANG, L.; WANG, W. 2023. Silver nanoparticle toxicity to the larvae of oyster *Crassostrea angulata*: contribution of in vivo dissolution. **Science Of The Total Environment**, v. 858, p. 159965, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159965>