



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA E LIMNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA

IDENTIFICAÇÃO DE *Giardia duodenalis* EM OSTRAS *Crassostrea sp*
DESTINADAS PARA O CONSUMO HUMANO NA ILHA DE SÃO LUÍS,
MARANHÃO

VÂNIA GOMES SILVA BERRÊDO

SÃO LUIS, MA / 2021

VÂNIA GOMES SILVA BERREDO

**IDENTIFICAÇÃO DE *Giardia duodenalis* EM OSTRAS *Crassostrea sp*
DESTINADAS PARA O CONSUMO HUMANO NA ILHA DE SÃO LUÍS,
MARANHÃO**

Monografia apresentada ao Curso De
Graduação em Oceanografia da Universidade
Federal do Maranhão, como requisito para
obtenção do Grau de Bacharel em
Oceanografia.

SÃO LUIS, MA /2021

Berrêdo, Vânia Gomes Silva.

Identificação de *Giardia duodenalis* em ostras *Crassostrea* sp destinadas para o consumo humano na ilha de São Luís, Maranhão / Vânia Gomes Silva Berrêdo. - 2021. 38 f.

Orientador(a): Katiene Regia Silva Sousa. Monografia (Graduação) - Curso de Oceanografia, Universidade Federal do Maranhão, Universidade Federal do Maranhão, Google meet, 2021.

1. Anomalia celular. 2. Extração de DNA. 3. *Giardia duodenalis*. 4. Moluscos bivalves. 5. PCR. I. Sousa, Katiene Regia Silva. II. Título.

VÂNIA GOMES SILVA BERREDO

**IDENTIFICAÇÃO DE *Giardia duodenalis* EM OSTRAS *Crassostrea sp*
DESTINADAS PARA O CONSUMO HUMANO NA ILHA DE SÃO LUÍS,
MARANHÃO**

Monografia apresentada ao Curso De
Graduação em Oceanografia da Universidade
Federal do Maranhão, como requisito para
obtenção do Grau de Bacharel em
Oceanografia.

Aprovada em _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Katiene Regia Silva Sousa (Orientador) (Orientador)

Prof. Dr. Walter Luis Muedas Yauri (UFMA)

Prof^ª. Dr^ª. Talita da Silva Esposito (UFMA)

DEDICATÓRIA

Aos meus avós e primo.
(*in memórian*) .

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar eu agradeço ao senhor meu Deus, pois sem ele seria impossível ser quem sou passar pelo que passei e chegar onde estou. A minha mãe pela confiança e por sempre ter acreditado que eu seria capaz. Aos meus filhos que são tudo que tenho nessa vida, presentes do meu Deus, assim como meu neto “Miguel um pequeno gênio”, meus irmãos que amo muito e são parte de mim, assim como não posso deixar de citar Ana Lucia Berrêdo e Antônio Fernando Berrêdo, que nessa caminhada sempre me deram força e acreditaram que eu chegaria até aqui.

Aos amigos (as) (UFMA) Samuel Araújo, Larissa Soeiro, Elienai Menezes, Brenda Barreto e que sempre estiveram junto de mim segurando os meus desesperos e tentando me acalmar, eles foram presentes valiosíssimos que o senhor meu Deus me permitiu conhecer, nunca os esquecerei, meus amigos amados.

Agradeço ao Prof. Walter Luís Muedas Yauri, por ter me recebido e me ajudado sempre que precisei e nunca colocou dificuldades para repassar seu conhecimento.

A todos os professores do departamento de oceanografia sem exceção, pois todos foram imprescindíveis para a minha formação tanto profissional como pessoal algumas palavras duras me fizeram crescer, embora não as tenha entendido no momento, mas digolhes que valeu a pena, tenho por todos vocês profunda e verdadeira gratidão.

E não poderia faltar meus agradecimentos a minha orientadora Katiene Regia Silva Sousa, por ter me recebido e acolhido sem saber que eu iria dar muito trabalho a ela e descobri uma pessoa incrível e maravilhosa da qual Deus me permitiu conhecer espero que eu consiga devolver a confiança que ela teve em mim, executando bem a minha tarefa.

Aos meus colegas do Laboratório de Aquicultura (AQUALAB) pelos momentos e pela convivência que mesmo em pouco tempo e com poucas palavras estivemos juntos e são pessoas maravilhosas e iluminadas.

A todos, meu muito obrigada!

Gratidão.

RESUMO

Moluscos bivalves por serem eficazes organismos filtradores, absorvem tudo que está na água para se alimentar, sendo assim, acumulam e concentram substâncias, partículas e até mesmo patógenos em seus tecidos quando os locais onde vivem ou são cultivados recebem cargas de efluentes contaminados. Assim, o consumo destes organismos de forma crua ou mal cozida em locais com a presença de organismos patógenos pode representar risco de contaminação alimentar para saúde humana. A giardíase é uma zoonose negligenciada causada por água e alimentos contaminados pelo protozoário *Giardia sp.* A presença desses protozoários patogênicos tem sido verificada em vários estudos em diferentes países. O presente estudo tem como objetivo detectar por meio de PCR, *Giardia duodenalis* nas glândulas digestórias em ostras *Crassostrea sp.* Para realização do estudo, foram adquiridas 150 amostras de ostras dos municípios de Paço do Lumiar, Raposa e São José de Ribamar. As ostras tiveram sua largura e comprimento mensurados e o peso da massa visceral, assim como, das glândulas digestórias. Foram formados 30 *pools* de glândula digestória, cada *pool* formado por 5 animais. Posteriormente, foi extraído o DNA das glândulas digestórias com o kit *DNeasy Blood & Tissue* e realizado, por meio de espectrofotômetro, as leituras das concentrações do DNA. Em seguida, foi feita a PCR (Reação de Cadeia de Polimerase). Foram realizadas coletas de água utilizando-se os materiais: garrafa de Van Dorn, refratômetro, kit de filtração para material particulado em suspensão - MPS e disco de Secchi; com obtenção dos dados “in situ” e em laboratório. Também foi realizada em cada grupo amostral a técnica do esfregaço utilizando o Kit Panóptico Rápido para análise citológica. Coletaram-se amostras de água para obtenção dos dados físico-químicos. A temperatura e a salinidade foram os parâmetros que mais influenciaram no crescimento das ostras de São José de Ribamar. Nas análises citológicas foram confirmadas nas ostras de São José de Ribamar e Paço do Lumiar a presença de micronúcleo o que pode ser considerado um indicativo prévio da existência de alteração celular e contaminação ambiental, além de células binucleadas e brotamentos. Não foi detectada a presença do protozoário *Giardia duodenalis* nas amostras de glândulas digestórias de ostras analisadas por PCR referentes aos três municípios estudados, porém foram encontradas alterações celulares nas brânquias.

Palavras chaves: PCR, *Giardia duodenalis*, Extração de DNA, Moluscos bivalves, Anomalia celular.

ABSTRACT

Bivalve molluscs for being effective filtering organisms, they absorb everything that is in the water to feed themselves, therefore, they accumulate and concentrate substances, particles and even pathogens in their tissues when the places where they live or are cultivated receive contaminated effluent loads. Thus, the consumption of these organisms raw or undercooked in places with the presence of pathogenic organisms may represent a risk of food contamination for human health. Giardiasis is a neglected zoonosis caused by water and food contaminated by the protozoan *Giardia sp.* The presence of these pathogenic protozoa has been verified in several studies in different countries. The present study aims to detect, by PCR, *Giardia duodenalis* in the digestive glands in oysters *Crassostrea sp.* To carry out the study, 150 samples of oysters were purchased from the municipalities of Paço do Lumiar, Raposa and São José de Ribamar. Oysters had their width and length measured and the weight of the visceral mass, as well as the digestive glands. Thirty *pools* of digestive gland were formed, each pool formed by 5 animals. Subsequently, DNA was extracted from the digestive glands with the *DNeasy Blood & Tissue* kit and, through spectrophotometer, readings of the DNA concentrations were performed. Then, PCR (Polymerase Chain Reaction) was performed. Water collections were performed using the materials: Van Dorn bottle, refractometer, filtration kit for particulate matter in suspension - MPS and Secchi disk; obtaining the data “in situ” and in the laboratory. The smear technique was also used in each sample group using the Rapid Panoptic Kit for cytological analysis. Water samples were collected to obtain physical-chemical data. Temperature and salinity were the parameters that most influenced the growth of oysters in São José de Ribamar. In the cytological analyzes, the presence of micronucleus was confirmed in the oysters of São José de Ribamar and Paço do Lumiar, which can be considered a previous indication of the existence of cellular alteration and environmental contamination, in addition to binucleated cells and budding. The presence of the protozoan *Giardia duodenalis* was not detected in the samples of oyster digestive glands analyzed by PCR for the three municipalities studied, but cellular alterations were found in the gills.

Key words: PCR, *Giardia duodenalis*, DNA extraction, Bivalve molluscs, Cell anomaly.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -- Mapa da ilha de São Luís - MA abrangendo os municípios de Raposa, Paço do Lumiar e São José de Ribamar.	16
Figura 2 -Amostras de ostras (<i>Crassostrea sp.</i>) comercializadas no município de São José de Ribamar-MA.....	18
Figura 3 -Termobloco a temperatura de 56°C.....	19
Figura 4 -Espectrofotômetro NanoDrop Lite.	19
Figura 5 -Amostras de DNA de glândulas digestórias identificadas e totalizando 30 <i>pools</i> . ..	20
Figura 6 -Coloração de lâmina por meio do Kit Panóptico.....	21
Figura 7 -Análise estatística referente aos dados de morfometria das ostras <i>Crassostrea sp.</i> nos municípios de Raposa (RAP), Paço do Lumiar (PL) e São José de Ribamar-MA.....	22
Figura 8 -PCR das amostras de glândulas digestórias totalizando 30 <i>pools</i> . De 1 a 15 são as amostras de Raposa, Paço do Lumiar e São José de Ribamar. C+ controle positivo e C- controle negativo.	29
Figura 9 -Citológica de brânquias de Ostra <i>Crassostreas sp.</i> do município de São José de Ribamar- MA (A- Micronúcleo; B- Binucleada; C- Brotamento e D- Binucleada.....	31
Figura 10 -- Análise Citológica de brânquias de Ostra <i>Crassostreas sp.</i> do município de Paço do Lumiar- MA (A- Micronúcleo; B- Binucleada; C- Brotamento e D- Binucleado).....	32

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -Disposição do quantitativo de ostras, <i>pools</i> e grupo amostral por município amostrado, da Ilha do Maranhão	17
Tabela 2 -Parâmetros físico-químicos referentes aos Municípios de Paço do Lumiar e Raposa.	24
Tabela 3 -Dados das concentrações de DNA e as razões 260/280.	28

SUMÁRIO

2 OBJETIVOS	15
2.1 Geral:	15
2.2 Específicos:	15
3 METODOLOGIA	16
3.1 Área de Estudo.....	16
3.2 Aquisição das ostras (<i>Crassostrea sp.</i>).....	16
3.3 Preparo das amostras para análise (<i>Crassostrea sp.</i>).....	17
3.4 Extração de DNA.....	18
3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	20
3.6 Análises de células branquiais	21
3.7 Parâmetros Físicos-químicos	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Variáveis morfológicas e parâmetros Físicos-Químicos.....	22
4.1.1 Salinidade	24
4.1.2 Clorofila a	25
4.1.3 pH	25
4.1.4 Oxigênio Dissolvido	26
4.1.5 Transparência.....	26
4.1.6 TSS	26
4.2 Análise molecular	27
4.3 Análise Citológica	30
4.3.1 Lâminas de Brânquias.....	33
5 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

O litoral maranhense é um ambiente rico em áreas estuarinas, essa condição favorece uma grande diversidade de recursos pesqueiros como peixes, sururu, sarnambi e ostras. A ostra é considerada um alimento de grande valor nutricional, essa particularidade deve-se pelo fato de ser uma rica fonte proteica e pelo seu alto teor de micronutrientes. É um importante constituinte da dieta das populações litorâneas, sendo o seu consumo um hábito alimentar diário em muitas comunidades de pescadores (CAVALCANTI, 2003).

O ambiente estuarino tem sido fortemente impactado pelas ações antrópicas através de fontes tanto pontuais como não pontuais, o que tem favorecido a degradação ambiental o escoamento de esgoto tanto doméstico quanto industrial, produtos de fins agrícolas, atividades marítimas, (KENNISH, 1991).

A água do mar tem sido elemento de grande preocupação no âmbito relacionado ao meio ambiente, Autoridades de todo mundo tem voltado seus olhares para resolução desse crescente problema que coloca a saúde humana em risco, esgotos têm sido lançados de forma *in-natura* no mar. Essa descarga indiscriminada de esgoto sem tratamento tem sido fator de contaminação do ecossistema tanto pela eliminação inadequada de esgoto e descargas ilegais de água residuais pelos resíduos industriais (GHOZZI *et al.* 2017). Segundo (ADANSON, 1857) A ostra-do-mangue *Crassostrea* é naturalmente encontrada em ambientes estuarinos, pois este possuem características oceanográficas favoráveis para o seu desenvolvimento o que torna essa regiões composta por manguezais *habitat* típico para o seu aparecimento, vivendo assim fixada naturalmente nas raízes do mangue ou em rochas (VARELA *et al.* 2007). A maricultura é reconhecida mundialmente pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO/ONU) como fonte alternativa relacionada a geração de emprego, renda e alimento, que tem contribuído para que as comunidades tradicionais permaneçam em seu lugar de origem.

Os moluscos bivalves são geralmente animais de corpo mole, dividido: em cabeça, pé e massa visceral (coberta pelo manto) disposta em posição central (BRUSCA, BRUSCA, 2007). Como o próprio nome indica, os bivalves são providos externamente de concha com duas valvas calcárias, que envolvem todo o corpo, são fechadas por músculos adutores, encaixadas em dobradiça dorsalmente e possuem simetria bilateral (RODRIGUES. 2010). A cabeça é rudimentar, sem olhos ou rádula, o pé é comprimido lateralmente e possui um par de brânquias que são utilizadas, juntamente com os palpos labiais, para filtragem do alimento (fitoplâncton e matéria orgânica particulada), além das trocas gasosas (BRUSCA, BRUSCA,

2007). Sendo assim, essa característica que comanda a respiração e filtragem dos alimentos (acima de 400 litros/dia) proporciona um crescimento rápido aos bivalves. Além disso, a mesma característica também é responsável pelo acúmulo de uma microbiota bacteriana diversificada, quando esta se encontra em águas poluídas, acaba tornando-se portadores de agentes patógenos que podem ser transmitidos ao homem, razão pela qual são usados como bioindicadores ambientais utilizados para verificar a qualidade do ecossistema marinho (BURKHAD; CALCII. 2000).

Segundo (SOUZA *et al.* 2012), os moluscos bivalves estão vulneráveis a possíveis contaminações decorrentes das condições sanitárias das águas de onde está sendo produzidos, o que os torna um elemento de preocupação com a saúde pública. As várias fontes de esgotos e materiais como água residual e outros que são lançadas na água são as responsáveis em comprometer a qualidade microbiológica dos moluscos que são consumidos de forma *in natura* podendo causar um risco de grandes proporções para saúde da população (GIANGASPERO *et al.* 2014).

A contaminação de alimentos por microrganismos é uma preocupação para a Saúde Pública mundial. Muitos países já reportaram a ocorrência de doenças causadas por microrganismos nos alimentos, incluindo agentes patogênicos como bactérias (*Salmonella spp.* e *Escherichia coli* enterohemorrágica) e parasitas (*Cryptosporidium spp.* e trematodas) (WHO, 2017). Os bioindicadores ambientais possuem um importante papel na avaliação da qualidade ambiental, neste contexto os moluscos bivalves são utilizados como indicadores de poluição tanto química quanto biológica. Como são organismos filtradores que se alimentam de partículas em suspensão na coluna d'água, acabam acumulando em suas brânquias materiais poluentes enquanto se alimentam, esse material também pode ser encontrado no trato intestinal deste animal mesmo que estes estejam em baixa concentração (TEI *et al.* 2016).

A qualidade microbiológica dos moluscos bivalves está relacionada com as condições sanitárias das águas onde são produzidos, (SOUZA *et al.* 2012). As fezes de origem humana e animal podem contaminar diversos ambientes como, por exemplo, terras agrícolas, águas urbanas, águas residuais, rios e águas costeiras levando à contaminação da água do mar. Se a contaminação chegar aos moluscos, estes quando ingeridos crus pelos consumidores, podem representar um risco potencial para a saúde (GIANGASPERO *et al.* 2014).

Segundo (DAWSON, 2005) e (EFSTRATIOU *et al.* 2017), as doenças entéricas transmitidas para o homem são causadas por parasitas, estas doenças são adquiridas através de alimentos contaminados e dentre os principais parasitas responsáveis por essa contaminação

estão *Cryptosporidium* e *Giardia*. Assim podemos encontrar em torno de 10 doenças causadas por agentes patógenos que estão diretamente ligados com a contaminação das águas estes são *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Legionella*, *Norovírus*, pelos *Shigella*, *Campylobacter*, *Salmonella*, Vírus da Hepatite A e *Escherichia coli* (CDC, 2014).

Embora os estudos mostrem que os protozoários são menos investigados que as bactérias e vírus, devemos ressaltar que os protozoários devem ser estudados, pois eles representam risco (PALOS LADEIROS *et al.* 2013). Uma das doenças de vinculação hídrica considerada um problema de saúde pública é a giardíase e mesmo assim, temos poucos estudos que referenciam esse problema no Maranhão, porém, as pesquisas a cerca desse protozoário deveriam ser realizadas frequentemente uma vez que os moluscos bivalves são fonte de renda para várias famílias e são consumidas de forma *in-natura* podendo causar sérios danos à saúde das pessoas. É necessário que sejam realizadas pesquisas como intuito de averiguar esse protozoário no ambiente aquático. O presente estudo teve como objetivo avaliar se há presença de *Giardia duodenalis* em ostras *Crassostrea sp* destinadas ao consumo humano na ilha de São Luís- MA.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

Detectar por meio de PCR, *Giardia duodenalis* em ostras *Crassostrea sp.*

2.2 Específicos:

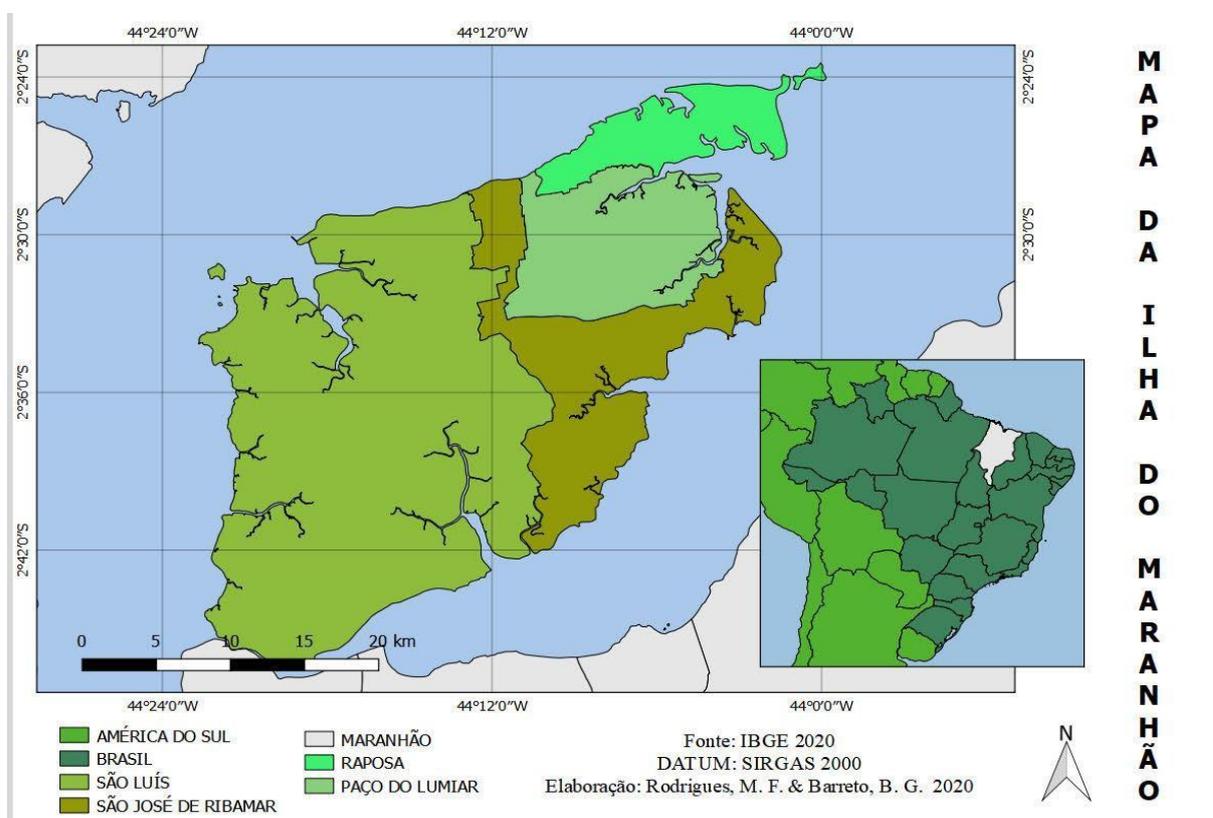
- Detectar por meio de PCR, *Giardia duodenalis* nas glândulas digestórias em ostras *Crassostrea sp.*
- Verificar a associação entre os dados ambientais e a presença de protozoário
- Analisar anomalias nas células de brânquias

3 METODOLOGIA

3.1 Área de Estudo

A Ilha do Maranhão encontra-se localizada no litoral norte do Estado do Maranhão, na região denominada de golfo maranhense, possuem quatro Municípios Paço do Lumiar (Área = 124,753 km²; Localização: 44,1°S e 2,53°W), Raposa (Área= 64,353 km²; Localização: 44,1°S e 2,42°W), São José de Ribamar (Área= 388,369 km²; Localização: 44,05°S e 2,56°W) e São Luís (Área= 834,780 km²; Localização: 44,3°S e 2,52°W), totalizando 1.412.255 km² de área estudada (IBGE, 2017).

Figura 1-- Mapa da ilha de São Luís - MA abrangendo os municípios de Raposa, Paço do Lumiar e São José de Ribamar.



3.2 Aquisição das ostras (*Crassostrea sp.*).

As ostras foram coletadas nos municípios de Paço do Lumiar, Raposa e São José de Ribamar, durante o período de 5 meses (fevereiro de 2020 a julho de 2020), totalizando as colheitas das ostras *Crassostreas sp.* Os dados referentes às marés, amplitude e horário, foram obtidos na tábua de marés publicada pela Diretoria de Hidrografia e Navegação do Ministério da Marinha (DHN) para os dias de coleta. As coletas foram realizadas em municípios distintos e por maricultores e marisqueiros sendo realizadas 6 coletas totalizando 150 ostras.

Na pesquisa foram utilizados 1 *pool* de ostras do município da Raposa, 2 *pools* de Paço do Lumiar e 3 *pools* de São José de Ribamar, e cada *pool* foi constituído por 5 animais, totalizando um tamanho amostral de 150 ostras (Tabela 01).

Tabela 1- Disposição do quantitativo de ostras, *pools* e grupo amostral por município amostrado, da Ilha do Maranhão.

MUNICÍPIO	FONTE	OSTRAS	<i>Pools</i> *	GLÂNDULA DIGESTÓRIA
Raposa	Cultivo	25	5	25
Paço do Lumiar	Cultivo	50	10	50
São José de Ribamar	<i>Estoque</i>	75	15	75
TOTAL		150	30	150

3.3 Preparo das amostras para análise (*Crassostrea sp.*).

Para realização do estudo, foram selecionadas 25 unidades de ostras, tamanhos aleatórios e coletadas manualmente, as ostras foram acondicionadas em caixas de isopor com gelo e em seguidas levadas para o laboratório de Aquicultura (AQUALAB), do Departamento de Oceanografia e Limnologia (DEOLI), da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) (Figura 2). Ao chegarem ao laboratório, elas foram dispostas em uma bancada para que fosse realizada a morfometria (comprimento e largura) com o auxílio de um paquímetro, em seguida as ostras foram pesadas em uma balança analítica de precisão separadamente na seguinte ordem: massa visceral total e glândula digestória. Ao término das medidas biométricas tanto da glândula como das brânquias foram fragmentadas e em seguida depositadas em microtubos de 1,5 mL e mantidos em refrigeração a - 20°C. As amostras das ostras utilizadas para realização do trabalho são pertencentes ao gênero *Crassostrea sp.* Essa é a classificação científica de acordo com (LOPES *et al.* 2018). Segundo estes pesquisadores existem no Maranhão duas espécies de ostras a *Crassostrea gasar* e *Crassostrea rhizophorae*.

Figura 2-Amostras de ostras (*Crassostrea sp.*) comercializadas no município de São José de Ribamar-MA.



Fonte: Autoral.

3.4 Extração de DNA

Os procedimentos para extração de DNA foram realizados no Centro de Pesquisa Clínica (CEPEC), do Hospital Universitário Presidente Dutra (HUUFMA). As etapas para a extração de DNA foram exercidas seguindo a metodologia do *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen).

A primeira etapa iniciou-se em separar os *pools* por cada município. Em microtubos de 1,5 ml, adicionou-se aproximadamente 5 mg de tecido da glândula digestória do molusco bivalve para a formação dos *pools*. Então, 180 μ L de tampão ATL foram adicionados, e logo após as amostras foram homogeneizadas com o equipamento homogeneizador de tecidos (Polytron®), ao fim da homogeneização adicionou-se 20 μ L de proteinase K em todas as amostras de glândulas digestórias. Em seguida, os microtubos foram levados ao vortex para serem agitados por 15 segundos e incubou-se no termobloco a temperatura de 56°C (Figura 03), até que ocorresse a lise completa do material, em aproximadamente 30 minutos. Ocasionalmente o vortex foi utilizado cerca de 15 segundos até o fim do período de incubação. Posteriormente, adicionou-se 200 μ L de tampão AL e misturou-se em vortex e as amostras foram incubadas a 56°C durante 10 minutos. Adicionou-se 200 μ L de etanol absoluto e agitou-se novamente no vortex durante 15 segundos.

Figura 3-Termobloco a temperatura de 56°C.



Fonte: Autoral.

Na segunda etapa, o material lisado foi pipetado para uma coluna *DNeasy Mini Spin* e colocada em microtubo coletor de 2 mL e centrifugada a 6000g (8000 rpm) durante 1 minuto. O microtubo coletor contendo o filtrado foi descartado e a coluna foi colocada em um novo microtubo coletor. Adicionou-se à coluna 500 µL do tampão AW1 e centrifugou-se durante 1 minuto a 6000g (8000 rpm). O microtubo coletor contendo o filtrado foi novamente descartado. A coluna foi colocada em novo microtubo, adicionou-se 500 µL de tampão AW2 e centrifugou a 20 000g (14 000 rpm) durante 3 minutos. Descartou-se novamente o microtubo coletor e colocou-se a coluna para um novo tubo de 2 mL.

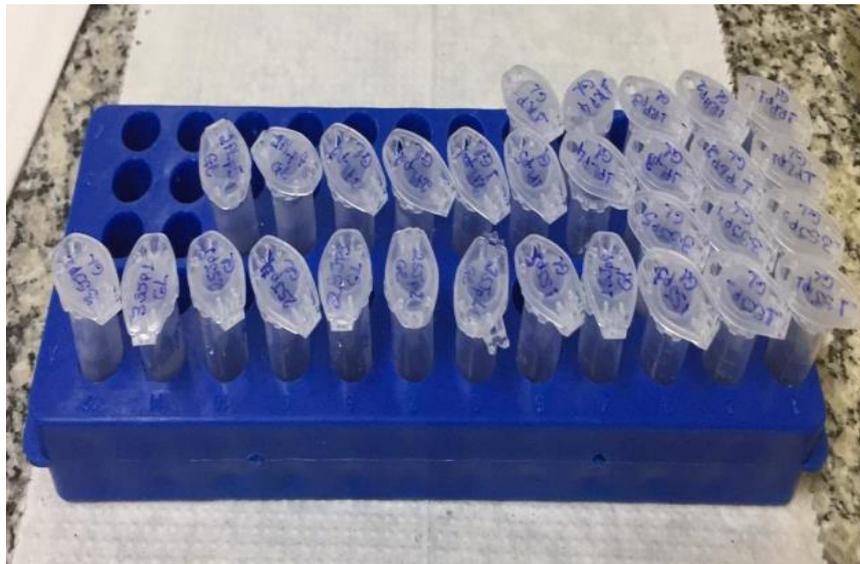
O DNA foi eluído com a adição do tampão AE ao centro da membrana, incubou-se por 1 min em temperatura ambiente (15-25 °C). Logo após, centrifugou-se a 6000g (8000 rpm) durante 1 minuto. A coluna foi descartada e a solução eluída de DNA foi mantida em microtubos de 1,5 mL. Posteriormente, a concentração de DNA das amostras foi analisada em espectrofotômetro *NanoDrop Lite* (Figura 04), e as amostras foram armazenadas a -20°C (Figura 05).

Figura 4-Espectrofotômetro *NanoDrop Lite*.



Fonte: Autoral.

Figura 5- Amostras de DNA de glândulas digestórias identificadas e totalizando 30 pools.



Fonte: Autoral.

3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A presença de DNA genômico do protozoário *Giardia duodenalis* foi investigada pelo método de PCR convencional por meio de oligonucleotídeos específicos para a espécie. Os iniciadores GGL405-433 (5'-CATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAA-3') e GGR592-622 (5'-TTTGTGAGCGCTTCTGTCTGGCAGCGCTAA-3') foram utilizados para amplificação de um fragmento de 218pb do gene beta giardina específico para *Giardia duodenalis* (MAHBUBANI *et al.* 1992).

As reações foram realizadas em volume total de 25µL contendo 1 x PCR buffer (Invitrogen®), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 25pmol de cada iniciador, 1,25 unidades de Taq Polymerase Platinum (Invitrogen®) e 3µL de DNA alvo. O controle negativo foi realizado com todos os constituintes padrões da mix do PCR sem o DNA e para o controle positivo utilizou-se o DNA de *Giardia duodenalis*. A reação em cadeia da polimerase foi realizada em termociclador ABI 7500 da Applied Biosystems® sob as seguintes condições: desnaturação de DNA a 94°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C 1 minuto, 72°C 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados da PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1,5 % e visualizados por luz UV.

3.6 Análises de células branquiais

Em cada grupo amostral foi realizada a técnica do esfregaço utilizando o Kit Panóptico Rápido (Figura 6). Desta forma, para cada *pool* amostrado de ostra foram realizado esfregaço do tecido de brânquia, totalizando quatro lâminas para cada grupo amostral. Assim, ao final do experimento foram vinte e oito lâminas de amostras do tecido. Com o auxílio de um microscópio óptico, óleo de imersão e uma câmera fotográfica, a leitura das lâminas contendo o material foi efetuada, visando as seguintes anomalias nas células: micronúcleo, brotamento e células binucleadas.

Figura 6-Coloração de lâmina por meio do Kit Panóptico



Fonte: Autoral.

3.7 Parâmetros Físicos-químicos

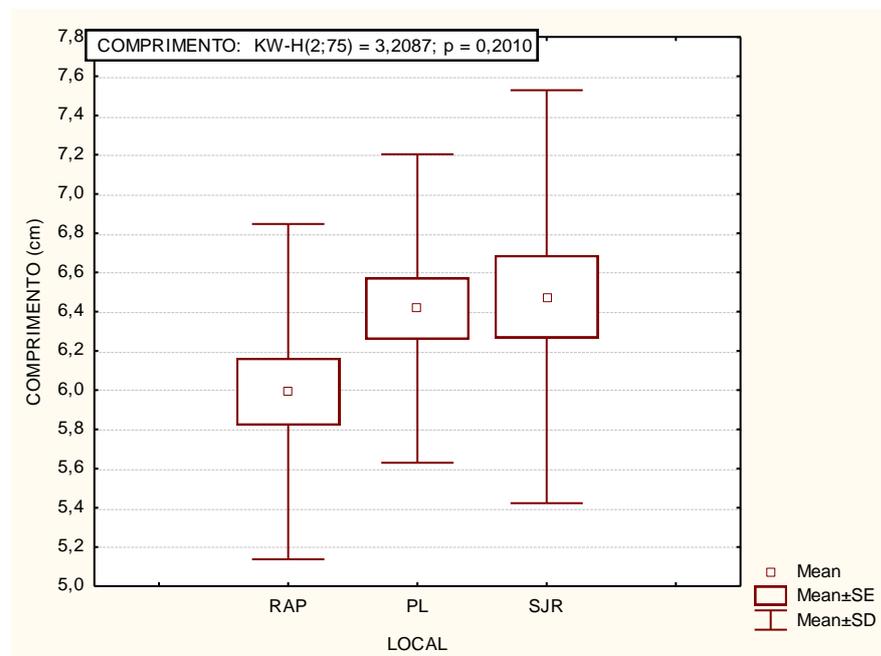
Foram registrados em cada local de coleta das ostras, os seguintes parâmetros da água: pH, oxigênio dissolvido, salinidade, temperatura (T C°), clorofila a (Cl^a) com o auxílio de um multiparâmetro AKSOAK88, e a transparência por meio do disco de Secchi

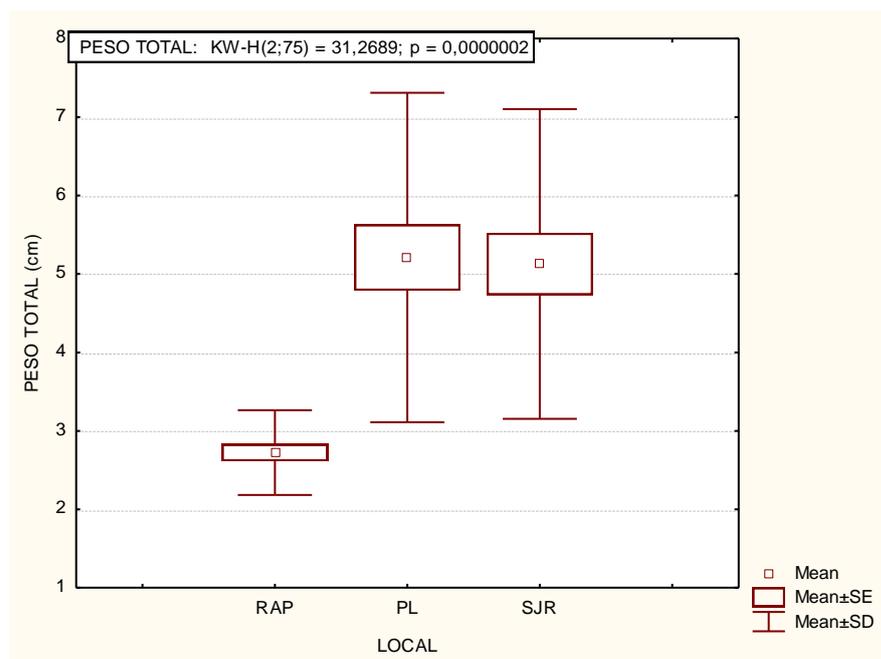
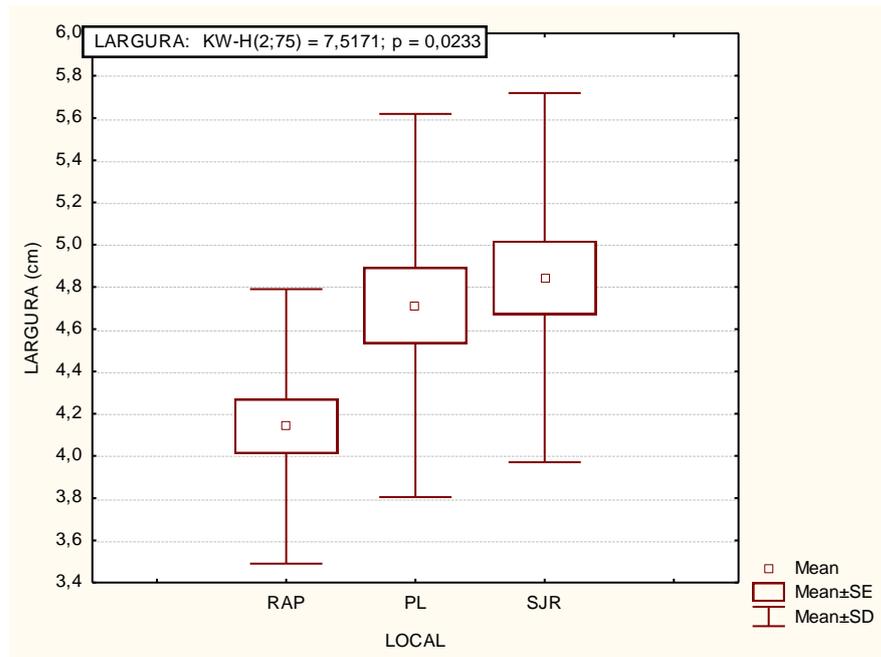
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Variáveis morfológicas e parâmetros Físicos-Químicos

As análises físico-químicas transparência, TSS, temperatura, pH, salinidade, oxigênio dissolvido e clorofila - a (Cl^a), foram analisadas a fim de caracterizar a água do estuário onde os bivalves foram coletados, também para entender como eles podem influenciar no crescimento das ostras *Crassostrea sp.* Cada variável mostra o que ocorre dentro do ambiente e tem importância para que possamos correlacionar os seus resultados com os processos que ocorrem no ambiente aquático. Os dados estatísticos referente a morfometria das ostras (comprimento, largura, peso total) encontram-se na Figura 07.

Figura 7-Análise estatística referente aos dados de morfometria das ostras *Crassostrea sp.* nos municípios de Raposa (RAP), Paço do Lumiar (PL) e São José de Ribamar-MA Ribamar (SJR).





Segundo (VINATEIA, 1999), os aspectos morfométricos das ostras *Crassostrea* relacionados ao peso e comprimento podem ser influenciados indiretamente por diversos fatores. A temperatura média da água registrada no referido estudo foi de 28,5 e 29,39 °C para os respectivos municípios (Tabela 02). De acordo com (CHAPARRO *et al.* 1998), uma das variáveis importantes e influenciadora do crescimento, da taxa de alimentação, do metabolismo, da sobrevivência e da reprodução dos organismos aquáticos é a temperatura,

esta variável é de suma importância na manutenção da vida desses organismos. A temperatura é um dos principais fatores limitantes referentes à variedade de processos biológicos aos 25 °C é considerada como excelente para o cultivo das ostras. Comparando-se os resultados deste trabalho com os dados obtidos no trabalho realizado por (MIRANDA; GUZENSKI, 1999) sobre o cultivo larval da ostra do mangue em diferentes condições de temperatura, salinidade e densidade, observou-se que no presente trabalho esta variável apresentou pequena amplitude de variação entre os dois municípios, isto sugere que este fator ambiental em decorrência de sua estreita variação não tenha afetado o crescimento das ostras.

Tabela 2-Parâmetros físico-químicos referentes aos Municípios de Paço do Lumiar e Raposa.

Local		T°C	Sal	TSS	OD	Cl-a	pH	Transp.
		Água	(gKg⁻¹)	(mg⁻¹)	(mgL⁻¹)	(mgm³)		(cm)
Paço do Lumiar	Media	28,5 ^a ±	12,5a±	86,06a±	4,97 ^a ±	5,43a±	7,35 ^a ±	30 ^a ±
	Desvio	00,71	3,54	31,03	1,15	4,10	0,07	0
Raposa	Media	29,39 ^a ±	28,11b±	0,67b±	3,69b±	2,44 ^a ±	7,48 ^a ±	18,83b±
	Desvio	1,81	11,93	0,65	1,30	1,86	1,15	20

4.1.1 Salinidade

Neste estudo os valores encontrados para salinidade de São Jose de Ribamar, Paço do Lumiar e Raposa foram respectivamente de 20, 12,5, 28,11 gKg⁻¹. A exposição das ostras à salinidade muito alta (acima de 35‰) faz com que ocorra o aumento do processo metabólico nas ostras, reduzindo sua energia a salinidade alta também contribui para que ocorra redução de materiais disponíveis para sua alimentação, comprometendo o crescimento das ostras. Nesse contexto, as taxas de ingestão podem ser reduzidas e culminar na morte e ou redução do crescimento (LOOSANOFF, 1952; BERNARD, 1983; ABBE *et al.* 2000; GUIMARÃES *et al.*, 2008). Dados de uma pesquisa feita por (GUIMARÃES *et al.* 2008) mostraram a influência de diferentes níveis de salinidade entre (5 a 60‰) relacionados a sobrevivência de *Crassostrea*. Quando os valores de salinidade estavam entre, 15 a 25 foram determinantes para maiores crescimento das ostras, e as salinidades de 5, 10, 30, 35 tiveram taxas de sobrevivência baixa. Esses mesmos autores sustentam que vários estudos apontam a baixa salinidade como causa de mortalidade nas ostras, isso ocorre devido ao aumento na filtração e consequentemente desenvolve a aceleração do metabolismo anaeróbio causando a mortalidade.

4.1.2 Clorofila a

Verificou-se nesta pesquisa que a maioria das concentrações encontra-se com valores de 5,43 mg/m³ em Paço do Lumiar e com 2,44 mg/m³ em Raposa.

Segundo (POLI, 1998), o valor mínimo da concentração de Cl^a necessários para o crescimento das ostras em regime de cultivo é de 4 mg/m³. Tendo em vista esses valores de referência citados pelo autor, podemos inferir que o valor referente ao município de Raposa encontra-se abaixo do estimado. Este resultado pode ser relacionado provavelmente pelo movimento da maré, ou seja, nas marés altas o fitoplâncton fica mais diluído, o que reduz sua concentração no meio. A produção primária pode ser estimada como a capacidade de um ecossistema, a partir de seus organismos clorofilados, sintetizar compostos orgânicos de elevado potencial energético utilizando energia radiante ou química, o que permite, a partir da mesma, estimar a disponibilidade alimentar para herbívoros e os demais consumidores da teia trófica. (PAIVA, 2001).

4.1.3 pH

Verificou-se que no presente estudo que o pH se apresentou com valores próximos, entre os municípios de Paço do Lumiar (7,35) e Raposa (7,48). Enquanto, São José de Ribamar (8,60), não apresentou diferença significativa (Tabela 02). Estando dentro dos padrões de 7,9 - 8,1, portanto, um nível considerado ideal para cultivo de ostra segundo, (NIKOLIC, 1970; PEREIRA *et al.* 2001; SIQUEIRA, 2008).

Segundo ESTEVES (1998), o pH tem papel fundamental nos processos de permeabilidade da membrana celular, o que ocorre é a interferência do transporte iônico intra e extra celular e entre os organismos e o meio.

Para (SWINGLE, 1961; CALABRESE 1969) os valores de pH com variações que se aproximam dos extremos 4 e 11, representam condições letais respectivas de acidez e alcalinidade para os organismos aquáticos, ou seja, quanto mais próximos o pH estiver dos valores extremos de (4 e 11) maior é a possibilidade de morte, observamos que os valores de pH dos municípios de Raposa, Paço do Lumiar e São José de Ribamar ver (Tabela 02), encontram-se dentro dos padrões normais para sobrevivência das ostras, portanto um nível considerado ideal.

Deduz-se então que esses valores não representam variações relevantes para interferir no crescimento da ostra.

4.1.4 Oxigênio Dissolvido

Foram encontrados os valores respectivos de 4,97, e 3,69 mgL⁻¹ de OD para os municípios de Paço do Lumiar e Raposa, não houve diferença estatística entre os municípios. Esperava-se que no período chuvoso a taxa de oxigênio dissolvido na água diminuísse, pois o aporte de água decorrente das chuvas elevaria o nível de água dos estuários consequentemente a matéria em decomposição presente na água e nas margens do canal causaria aumento no consumo de oxigênio provocando uma redução nas taxas de oxigênio dissolvido.

Comparando-se os resultados com os dados obtidos no trabalho realizado por (NIKOLICK, 1970; REYES, 1995), as concentrações adequadas de oxigênio dissolvido para o cultivo de ostras do mangue, devem estar entre 2 e 5 mg/L. Concentrações com níveis menores de oxigênio dissolvido podem gerar danos aos organismos, pois esses valores geram estresse e até mesmo à morte, quando relacionados o um maior tempo de exposição, outro problema e a vulnerabilidade dos organismos que são fragilizados pela redução de alimentos tornando-os mais propensos a contrair enfermidades e tornando-os vulneráveis aos ataques de animais predadores (RAMOS, CASTRO, 2004).

4.1.5 Transparência

A transparência da água apresentou valores de 30 e 18,83cm respectivamente (Tabela 02). Este parâmetro pode estar associado com a quantidade de material particulado e dissolvido presente no ambiente, que impedem que a incidência de luz penetre na coluna de água, também pode estar sofrendo influência da dinâmica hidrográfica local, assim como ação da maré e pluviosidade. Esses valores não apresentam relação com o crescimento das ostras. A medida de transparência é considerada inversamente proporcional à quantidade de compostos orgânicos e inorgânicos no caminho ótico. (ESTEVES, 1998).

4.1.6 TSS

Os sólidos suspensos atingiram concentrações de 86,06 g/l em Paço do Lumiar e 0,67 g/l em Raposa. O total de matéria dissolvida (TSS) representa indica a massa total de partículas em suspensão que podem ser quantificadas e medidas por unidade de volume de água. O TSS inclui tanto material de origem inorgânica (minerais e algas) como de origem orgânica (detritos e fitoplâncton) possui importante papel no monitoramento da água, pois estão diretamente relacionados com a produção primária, assim como transporte de sedimentos e a turbidez, os quais são utilizados como indicadores da qualidade da água a (DEKKER *et al.* 2002). os valores totais de sólidos suspensos não apresentam interferência no crescimento das ostras.

No presente estudo as ostras de São José de Ribamar e Paço do Lumiar apresentaram crescimento semelhante quando comparadas as de Raposa, essa condição pode ter sido provavelmente influenciada por fatores abióticos e bióticos uma vez que, de acordo com diversos estudos como os citados pelos autores (MIRANDA e GUZENSKI,1999) ao mencionarem a temperatura ideal para o crescimento das ostras fica em torno de 15 a 25 °C, as temperaturas mais elevadas podem interferir na disponibilidade de nutrientes, pois a alta penetração de luz na coluna d'água tem uma influência direta na produção do fitoplâncton elevando as taxas na produção primária

No presente estudo, os municípios de Raposa e Paço do Lumiar apresentaram diferença estatística com relação aos dados de clorofila-a, salinidade, oxigênio dissolvido, TSS, e transparência mostrando diferenças significativas. Já os valores referentes ao pH, não apresentou diferença estatística segundo a (.Figura 7) Sugere-se que as ostras de São Jose de Ribamar e Paço do Lumiar possuam as mesmas condições ambientais visto que apresentam semelhança nos dados morfométricos. As condições morfométricas das ostras de Raposa se diferenciam dos outros dois municípios por se tratar de espécies diferentes.

Foi observado neste estudo que as ostras de São José de Ribamar apresentaram maior tamanho e a salinidade local estava em torno de 20, essa característica pode estar relacionada ao aporte de água doce ocasionada por águas subterrâneas que afloram e desaguam naquela região no ponto onde as ostras se encontram, essa condição ambiental pode contribuir para uma relativa estabilidade térmica da ostra favorecendo o seu crescimento. Outro ponto a ser mencionado foi o crescimento do musculo adutor das ostras de São José de Ribamar que se diferenciava dos outros dois pelo seu tamanho e consistência, podendo estar relacionado a condições da velocidade da corrente que passa no local. De todos os fatores abióticos que podem afetar a biologia da ostra, a temperatura e a salinidade, por seu efeito sinérgico, são provavelmente de maior impacto na sobrevivência e crescimento desses organismos (SHUMWAY, 1996).

4.2 Análise molecular

As razões de pureza indicam a qualidade da extração de DNA ou RNA, principalmente por acusar contaminações com proteínas e compostos fenólicos. A pureza determina o quanto é significativa à leitura obtida a 260 nm em relação ao DNA presente na amostra. A razão entre as absorbâncias medidas a 260 nm e 280 nm é a forma mais conhecida de controle de qualidade de uma extração de DNA. Os dados das concentrações de DNA das glândulas digestórias de ostras e as razões seguem em tabela abaixo (Tabela 03).

3-Dados das concentrações de DNA e as razões 260/280.

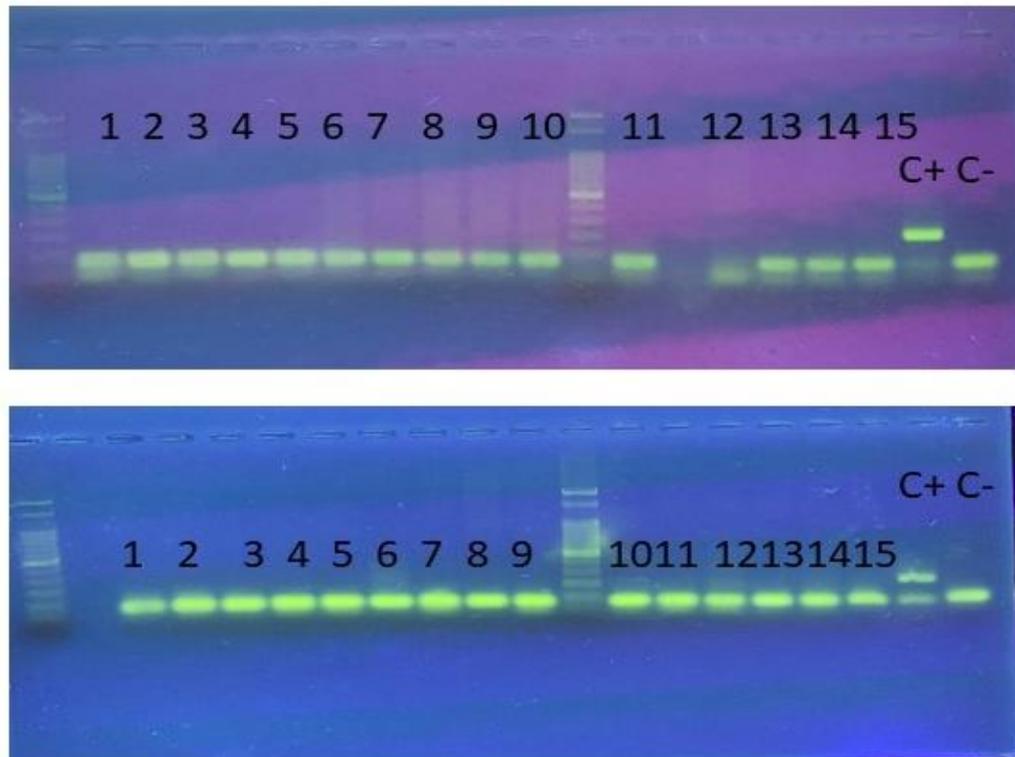
<i>Pool</i>	ng/μL	Razão260/280
1PLp1	677,6	2,04
1PLp2	163,2	2,09
1PLp3	627	2
1PLp4	271,5	2,07
1PLp5	608,7	2,05
2PLp1	1649,4	1,83
2PLp2	2185	1,96
2PLp3	2748,1	1,99
2PLp4	1004,4	1,75
2PLp5	2039	1,86
1Rp1	376,9	2,06
1Rp2	1110,8	2,13
1Rp3	447,5	2,12
1Rp4	607,4	2,05
1Rp5	454,8	2,05
1SJp1	324,1	2,13
1SJp2	276	2,04
1SJp3	436,2	1,94
1SJp4	130,5	1,84
1SJp5	327,3	1,94
2SJp1	968,3	1,84
2SJp2	365,3	2
2SJp3	489,2	1,76
2SJp4	266,8	1,89
2SJp5	412,5	1,81
3SJp1	814,1	1,54
3SJp2	1351,1	1,77
3SJp3	251,6	1,99
3SJp4	1048	1,64
3SJp5	1035,7	1,73

*PL: Paço Do Lumiar; R: Raposa; SJ: São José De Ribamar

O resultado da divisão expressa à proporção entre a quantidade de DNA e a quantidade de proteínas extraídas. Os valores almejados são 1.8 aceito como DNA “puro” e 2.0, aceito como RNA “puro”. A maior parte do DNA extraído apresentou razão dentro do esperado, com exceção de algumas amostras que apresentaram razão inferior a 1.8, o que significa que houve absorção de compostos ácidos durante a extração, excesso de compostos

fenólicos, que é muito utilizado nos métodos de extração e aqueles que tiveram valores iguais ou acima de 2.0 demonstram que há excesso de proteínas ou compostos básicos, entretanto, não foram suficientes para interferir na PCR.

Figura 8-PCR das amostras de glândulas digestórias totalizando 30 *pools*. De 1 a 15 são as amostras de Raposa, Paco do Lumiar e São Jose de Ribamar. C+ controle positivo e C- controle negativo.



Fonte: Autoral.

Na análise de PCR, não foi encontrada nenhuma amostra positiva para *Giardia duodenalis* nas glândulas digestórias das ostras, conforme figura 07; apesar de ser um parasita com elevado potencial de dispersão ambiental, seus cistos podem ser distribuídos ao longo da coluna d'água, o que garante a sua propagação para diversos organismos aquáticos, principalmente para os animais filtradores que também são utilizados como alimentos.

Conforme (GUIGUET LEAL 2018) encontrou *Giardia duodenalis* em 41,6% das amostras de ostras cultivadas assim como na água de cultivo. O subgenótipo AII foi evidenciado em uma amostra. As ostras depuradas apresentaram a maior contaminação: 58,3% das amostras continham cistos de *Giardia sp.* e 3 delas pertenciam ao subgenótipo AII.

Segundo (SANTOS, 2019), foi realizada a pesquisa no rRna de *Giardia* utilizando 29 amostras de ostra (15,3%). Dentre análises feitas 29 positivas das 12 sequenciadas obtiveram resultados satisfatórios, assim a espécie *Giardia* foi identificada com 99-100% de homologia

com sequência de referência. Foram verificadas as posições nucleotídicas e foram caracterizadas

São poucos os trabalhos que buscam detectar protozoários em alimentos, uma vez que estabelecida uma legislação adequada para o controle sanitário do cultivo de moluscos bivalves no Brasil a fim de garantir a segurança alimentar. O mais comum é a procura quantitativa, em UFC, de *Salmonella sp.* e a quantidade de coliformes totais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. As pesquisas realizadas para confirmar a presença de cistos em água marinha não são frequentes, mas existem achados em praias e regiões estuarinas no mundo (ROBERTSON *et al.* 2007). Não foram encontrados dados sobre a balneabilidade na região de São José de Ribamar que pudesse explicar as variáveis bacteriológicas da água.

Alguns autores relatam sobre a existência de uma forte relação entre a quantidade de chuvas e a incidência de cistos e na água do rio e também na água do mar, que culmina no aumento da proliferação de protozoários no ambiente aquático nesse período, pois sua dispersão é bem maior que as que ocorrem em períodos de estiagem, pois nos períodos de estiagem os cistos de giárdia podem aderir às partículas suspensas na água acumulando-se ao longo do leito dos rios e ao iniciar as chuvas ocorre a lixiviação do material assim como, o revolvimento do sedimento de fundo, esse processo faz com que a quantidade de cistos tenham maiores concentrações no ambiente (ATHERHOLT *et al.* 1998; ROSE *et al.* 2000; CURRIERO *et al.* 2001; DWIGHT *et al.* 2002).

4.3 Análise Citológica

As análises citológicas confirmaram nas ostras a presença de micronúcleo o que pode ser considerado um indicativo prévio da existência de alteração celular, além do micronúcleo foram encontrados células binucleadas e brotamentos. As ostras que apresentaram maior índice de alterações celulares foram as de São José de Ribamar, ao coletarmos as ostras foi possível observar a presença de pontos de lançamento de esgoto em toda margem do cais, o que possivelmente pode estar contribuindo para o aparecimento dessas anomalias. Estudos mais apurados e o uso de outras técnicas se fazem necessárias para entendermos melhor essas anomalias.

Figura 9-Citológica de brânquias de Ostra *Crassostreas sp.* do município de São José. de Ribamar- MA (A- Micronúcleo; B- Binucleada; C- Brotamento e D- Binucleada.

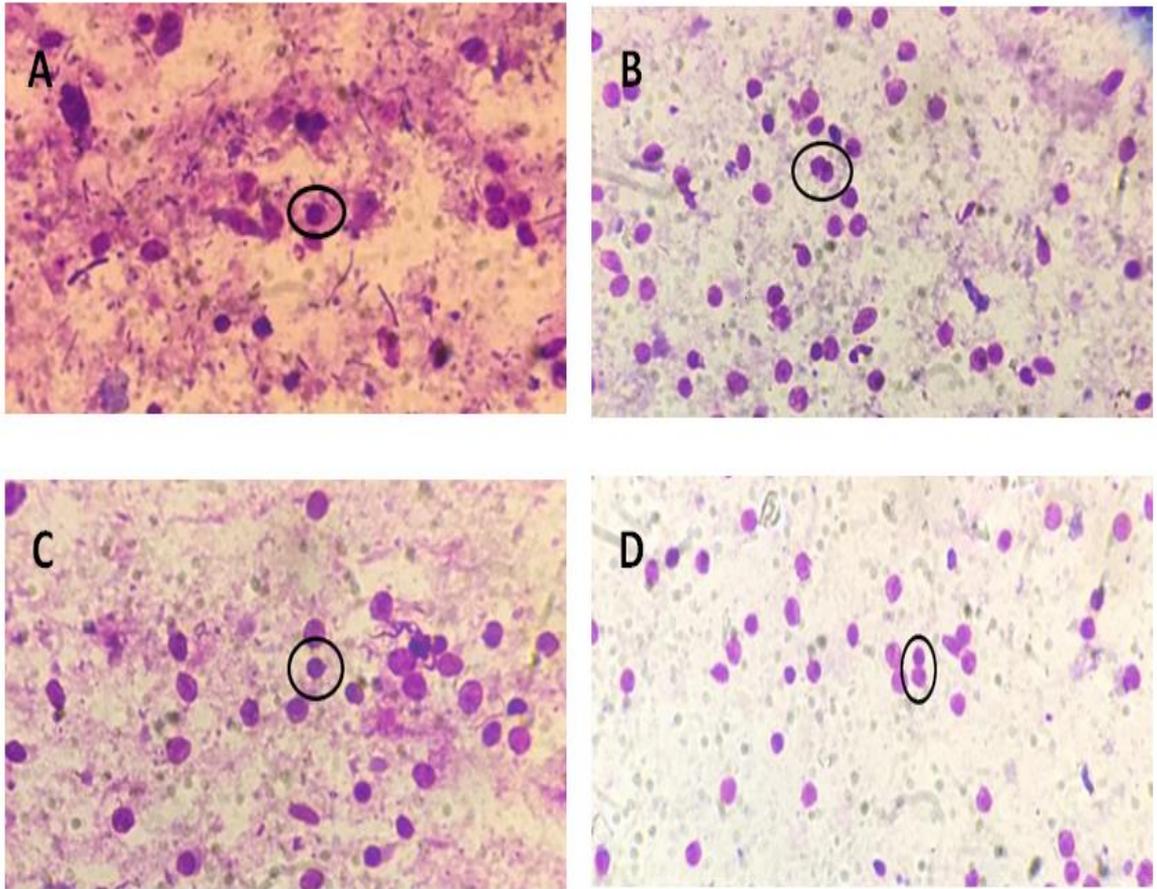
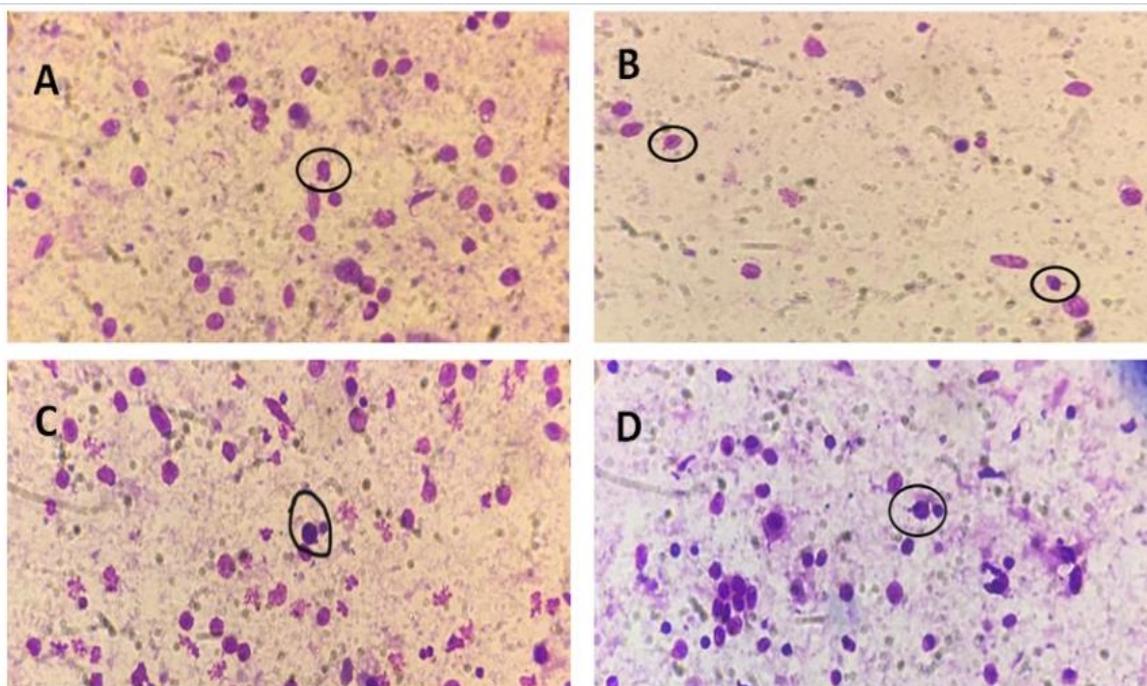


Figura 10-- Análise Citológica de brânquias de Ostra *Crassostreas sp.* do município de Paço do Lumiar- MA (A- Micronúcleo; B- Binucleada; C- Brotamento e D- Binucleado).



O lançamento de esgotos de forma *in-natura* contribui para a introdução de micro-organismos que são levados até as praias através de cursos de água, assim o lançamento de esgoto advindo de residências sem tratamento torna-se um grande fator de poluente para os moluscos bivalves (DWIGHT *et al.* 2002; FAYER *et al.* 2004).

As *Giardias* geralmente são encontradas com frequência em áreas onde ocorre o despejo de esgoto, assim temos que estas áreas sofrem impactos e tornando-se ambientes favoráveis para a entrada de micro-organismos (BROOKES *et al.* 2004). Contudo, podemos observar que os grandes índices da pluviosidade nos ambientes aquáticos são contribuintes para a proliferação e aumento de casos que estão relacionados a vários eventos de surtos de giárdia. Também foram relatados casos que ocorreram em áreas destinadas a recreação que após serem utilizadas por banhistas mostraram um significativo aumento de casos evidenciando surtos da doença. (ROSE *et al.* 2000). Ao que se refere à precipitação, temos que quanto maior a intensidade de precipitação, maiores são as possibilidades de infecção relacionadas a veiculação hídrica. Assim, estudos apontam que os surtos ocorridos nos Estados Unidos aconteceram logo após o aumento da precipitação de chuvas muito fortes, fato relacionado a mais 50% dos casos que ali ocorreram (CURRIEIRO *et al.* 2001). Desta forma, é razoável apontar que o aumento da precipitação possa ocasionar, conseqüentemente, o aumento de infecções relacionadas por veiculação hídrica.

A água do rio ao entrar em contato com a água do mar sofre um efeito de diluição, esse processo acaba dificultando a dispersão dos protozoários por causa da concentração da salinidade (BRADFORD; SCHIJVEN, 2002.) quanto maior forem os valores de salinidade menor será a dispersão dos protozoários. No presente estudo não foi verificada presença de DNA de giárdia nas ostras *Crassostrea sp.*

4.3.1 Lâminas de Brânquias.

A análise dos tecidos dos moluscos bivalves sob condições naturais de contaminação revelou alterações nos tecidos branquiais. Devido às características do trato gastrointestinal das ostras, o homogenado produzido pela glândula digestória revela-se espesso, viscoso e contém uma grande quantidade de muco e lipídeos o que dificulta a fluidização deste tecido. Desta forma e devido à espessura do material na lâmina foi utilizada a brânquia (LEAL *et al*, 2008). No presente estudo não foi verificada presença de DNA de giárdia nas ostras *Crassostrea sp.*

5 CONCLUSÃO

A temperatura e a salinidade foram os parâmetros que mais influenciaram nas medidas morfométricas relativas ao crescimento das ostras do município de São José de Ribamar. Nas análises citológicas foram confirmadas nas ostras de São José de Ribamar e Paço do Lumiar a presença de micronúcleo o que pode ser considerado um indicativo prévio da existência de alteração celular e contaminação ambiental, além de células binucleadas e brotamentos. Não foi detectada a presença do protozoário *Giardia duodenalis* nas amostras de glândulas digestórias de ostras analisadas por PCR referentes aos três municípios estudados, porém foram encontradas alterações celulares nas brânquias.

REFERÊNCIAS

ATHERHOLT, T. T. B.; LECHEVALIER, M. W.; NORTON, W. D.; ROSEN, J. S. BARNABÉ, G. **Bases biológicas y ecológicas de la Acuicultura**. Zaragoza: ed. Acribia, 1996. 519p.

BRADFORD, S. A.; SCHIJVEN, J. **Release of *Cryptosporidium* and *Giardia* from dairy calf manure: impact of solution salinity**. Environ. Sci. Technol. 36: 3916- 3923, 2002.

BROOKES, J. D.; ANTENUCCI, J.; HIPSEY, M.; MICHAEL, D. BURCH.; ASHBOLT, N. J.; FERGUSON, C. **Fate and transport of pathogens in lakes and reservoirs**. Environ. Internat. 30: 741-759, 2004.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrados**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2007. 968p.

BURKHARDT, W.; CALCII, K. R. 2000. **Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness**. Appl. Environ. Microbiol., v.66, n.4, p.1375-1378, 2000.

CALABESE, A.1969. Ser. Tech. Paper 42, 10.

CANTUSIONETO, R. **First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and cockles (*Tivela mactroides*) in Brazil**. J. Wat. Health. 6: 527-532, 2008.

CAVALCANTI, A. D. **Monitoramento da contaminação por elementos traço em ostras comercializadas em Recife, Pernambuco, Brasil**. Cadernos de Saúde Pública. v. 19, n.5, p. 1545-1551, 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL and Prevention. **Multistate outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to ground beef (final update)**. 2014 [acesso em: dia mês ano]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ecoli/2014/O157H7-05-14/index.htm>

CHAPARRO, O. R. *et al.* **Manual de Cultivo de La ostra chilena (*Ostrea chilensis*)**. . Ed. da Universidade Austral de Chile/Instituto de Biología Marina, 1998. 16 p. il. 15 cm.

CISNEROS, R e J. E. VINATEA. 1988. **Implementación de un Laboratorio de Producción de Alimento vivo para desarrollar la larvicultura de moluscos, peces, y crustáceos**.IMARPE-Lima.

CURRIERO, F. C.; PATZ, J. A.; ROSE, J. B.; LELE, S. **The association between extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States**. Am. J. Public. Health. 91:1~[948-1994, 2001.

DAWSON, David - **Foodborne protozoan parasites**. International Journal of Food Microbiology. ISSN 01681605. 103:2 (2005) 207–227.

DEKKER, A.; VOS, R.; PETERS, S. **Analytical algorithms for lake water TSM estimation for retrospective analysis of TM and SPOT sensor data.** International Journal of Remote Sensing, v.23, n. 1, p. 15 – 35, 2002.

DWIGHT, R. H.; SEMENZA, J. C.; BAKER, D. B.; OLSON, B. H. **Association of urban runoff with a coastal water quality in orange country, California.** Wat. Environ. Res. 74: 82-90, 2002.

Effect of rainfall on *Giardia* and *Cryptosporidium*. J. AWWA. 90: 66-80, 1998

EFSTRATIOU, Artemis; ONGERTH, Jerry E.; KARANIS, Panagiotis - **Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011–2016.** Water Research. ISSN 18792448. 114:2017) 14–22.

ESTEVEES, F. **Fundamentos de Limnologia.** 2º ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998. 602 p.

FAO. **Global Aquaculture Production 1950-2009.** Rome, Food and Agriculture Organization. 2009. Disponível em: www.fao.org/fishery/statistics. Acesso: 15/05/2011.

FAYER, R.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.: **from land to sea.** Trends. Parasitol. 20 (11): 531- 536, 2004a.

FERGUSON, C. M.; COOTE, B. G.; ASHBOLT, N. J.; STEVENSON, I. M. **Relationships between indicators, pathogens, and water quality in a estuarine system.** Wat. Res. 30: 2045-2054, 1996.

FERREIRA, S. A. **Dinâmica nictimeral de parâmetros hidroquímicos no baixo-estuário do rio salgado, com potencial à maricultura, no povoado de Paquatua *Giardia duodenalis* /Alcântara-MA (período chuvoso).** Maranhão: [s. n.], 2001 61 p.

FIORUCCI, A.R. e BENEDETTI- FILHO, E. **A importância do oxigênio dissolvido em ecossistemas aquáticos.** Química Nova na Escola, n. 22, p. 10-16, 2005.

GALTSOFF, P. S. **The american oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1971).** United Station: Fish and Wildlife Service, 1964. 64 p

GEBEL, J.; VACATA, V.; EXNER, M. **Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall and runoff.** Appl. Environ. Microbiol. 68: 2188-2197,

GHOZZI, Khemissa *et al.* - **First report of Tunisian coastal water contamination by protozoan parasites using mollusk bivalves as biological indicators.** Marine Pollution Bulletin. ISSN 18793363. 117:1–2 (2017) 197–202.

GIANGASPERO, ANNUNZIATA *et al.* - **International Journal of Food Microbiology *Cryptosporidium parvum* genotype IIa and *Giardia duodenalis* assemblage A in *Mytilus galloprovincialis* on sale at local food markets.** International Journal of Food Microbiology. ISSN 0168-1605. 171:2014) 62–67. 2002.

GUIGUET LEAL, D.A.; SOUZA, D. S. M.; CAUMO, K. S.; FONGARO, G., PANATIERI, L.F.; DURIGAN, M.; ROTT, M.B.; BARARDI, C.R.M.; FRANCO, R.M.B.

Genotypic characterization and assessment of infectivity of human waterborne pathogens recovered from oysters and estuarine waters in Brazil, Water Research, 2018, doi: 10.1016/j.watres.2018.03.024

GUIMARÃES, I.M.; ANTONIO, I.G.; PEIXOTO, S.; OLIVERA, A. 2008 **Influência da salinidade sobre a sobrevivência da ostra-do-mangue, *Crassostrea rhizophorae***. *Arquivos de Ciências do Mar*, 41(1): 118-122.

KENNISH, M. J. **Ecology of estuaries: anthropogenic effects**. Boca Raton: CRC Press. 1991. 494p.

KISTEMANN, T.; CLABEN, T.; KOCH, C.; DANGERDORF, F.; FISCHEDER, R.; LEAL, D. A. G., PEREIRA, M. A.; FRANCO, R. M. B., BRANCO, N.; MIRANDA, M. B. B. & GUZENSKI, J. *Arquivos de ciências do mar*. **Cultivo larval da ostra do mangue, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828), Em diferentes condições de temperatura, salinidade e densidade**. Vol. 32, Fortaleza: UFC. P. 73 – 84, 1999 .

LOOSANOFF, V.L. 1952 **Behavior of oysters in water of low salinities**. *Proceedings of the National Shellfisheries Association*, 43(1): 135-151.

LEAL, D. A. G., PEREIRA, M. A.; FRANCO, R. M. B., BRANCO, N.; CANTUSIONETO, R. First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and cockles (*Tivela mactroides*) in Brazil. *J. Wat. Health*. 6: 527- 532, 2008.

LOPES, R. G. P. S. et al. **Identificação Molecular de Ostras Nativas na costa do Maranhão, Brasil**. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 44, n. 4, p. 2725-2729, 2018.

MIRANDA, M.B.B.; GUZENSKI, J. **Cultivo larval da ostra do mangue, *Crassostrearhizophorae* (Guilding, 1828), em diferentes condições de temperatura, salinidade e densidade**. *Arquivos de Ciências do Mar*, UFC, v.32, p.73- 84, 1999.

MONTANINH,N.R. **Influência de variáveis ambientais sobre o desenvolvimento de ostras *Crassostrea* (Sacco, 1897) na Baía de Guaratubá, Brasil**. Dissertação (Mestrado) –Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 64p, 2011.

NICKOLIC, M. e Alfonso, S.J. **El ostión del mangle Cras-** *Arq. Ciên. Mar*, Fortaleza, 2013, 46(1): 62 - 75 *Crassostrea rhizophorae* (Guilding 1828): explotación del recurso y posibilidades para el cultivo. *FAO Fish. Rep.*, Rome, v.71, n.2, p.209-218, 1971.

OLIVEIRA, J.; CUNHA, A.;CASTILHO, F.; ROMALDE, J.L.; PEREIRA, M.J. **Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives - A mini-review**. *Food Control*, v.22, p.805-816, 2011.

ORTEGA, C.; SOLO-GABRIELE, H.M.; ABDELZAHER, A.; WRIGHT, M.; DENG, Y.; STARK, L.M. **Correlations between microbial indicators, pathogens, and environmental factors in a subtropical Estuary**. *Marine Pollution Bulletin*, v. 58, p. 1374-1381, 2009.

PAIVA, R. S. **Parâmetros, Físicos, químicos, biomassa e produção primária do fitoplâncton na Plataforma Continental Amazônica**, 1 ed. São Paulo [s.n.]: 2001. 153 p.

PALOS LADEIRO, M. *et al.* - **Protozoa interaction with aquatic invertebrate: Interest for watercourses biomonitoring**. Environmental Science and Pollution Research. ISSN 09441344. 20:2 (2013) 778–789.

POLI, C.R. **Biologia e cultivo de ostras**. Ed. UFSC. Florianópolis. 1998, 70 p.

RAMOS, R.S. e CASTRO, A.C.L. **Monitoramento das Variáveis Físico-Químicas no Cultivo de *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca) (Guilding, 1928) no Estuário de Paquatua-Alcântara/MA, Brasil**. Bol. Lab. de Hidrobiol, São Luís, v.17, n.1, p.29-42, 2004.

REYES, L.M.A. 1995. **Fundamentos de aquicultura marina**. Santafé de Bogotá, 225 p., 1995.

RIBEIRO ,E.B. **Ostras do gênero *Crassostrea* como bioindicadores de poluição aquática na Ilha de São Luís – MA**. Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 78p,2015.

ROBERTSON, L. J. **The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: a review**. Int. J. Food. Microbiol. 120: 201-216, 2007.

ROSE, J. B.; DAESCHNER, S.; EASTERLING, D.; CURRIERO, F.; LELE, S.; PATZ, J. **Climate and waterborne disease outbreaks**. J. Am. Wat. W. Assoc. 92: 77-87, 2000.

ROSE, J. B.; HUFFMAN, D. E.; GENNACCARO, A. **Risk and control of waterborne cryptosporidiosis**. FEMS. Microbiol. Rev. 26: 113-123. 2002.

RUPPERT, E. E.; FOX, R.S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 7. ed. São Paulo: Roca, 2005. 1145p.

SOUZA, D.S.M.; RAMOS, A.P.D.; NUNES, F.F.; MORESCO, V.; TANIGUCHI, S.; LEAL, D.A.G.; SASAKI, S.T.; BÍCEGO, M.C.; MONTONE, R.C.; DURIGAN, M.; TEIXEIRA, A.L.; PILOTTO, M.R.; DELFINO, N.; FRANCO, R.M.B.; MELO, C.M.R.; BAINY, A.C.D.; BARARDI, C.R.M. **Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters**. Ecotoxicology and Environmental Safety, v.76, p.153-161, 2012.

SHUMWAY, S.E. Natural environmental factors. In: Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, A.F. (Eds.), **The Eastern Oyster *Crassostrea virginica***. Maryland Sea Grant College, College Park, pp. 467–513, 1996.

SWINGLE. H. S. 1961. **Relationships of pH pond water to their suitability for fish culture** Proc. Pacific Sci. Congress (1957) vol. 10, fisheries, pp72-75.

TEI, Freda F. *et al.* - **Assessment and molecular characterization of human intestinal parasites in bivalves from orchard beach, NY, USA.** International Journal of Environmental Research and Public Health. ISSN 16604601. 13:4 (2016).

TORO, J. E.; PAREDES, P. I.; VILLAGRA, D. J.; SENN, C. M. 1999. **Seasonal variation in the phytoplanktonic community, seston and environmental variables during a 2-year period and oyster growth at two mariculture sites, southern Chile.** Marine Ecology, 20 (1): 63-89.

VARELA, E.S.; BEASLEY, C.R.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; MARQUES-SILVA, N.S.; TAGLIARO, H. 2007 **Molecular phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil.** *Journal of Molluscan Studies*, 73(3): 229-234.

VINATEA, L. **A Aquicultura e desenvolvimento sustentável: subsídios para formulação de políticas de desenvolvimento da aquicultura brasileira.** Florianópolis: UFSC, 1999. 310 P

WHO - World Health Organization - (JECFA), **FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**, atual. 2017. b. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/areas_work/chemicalrisks/jecfa/en/>