



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL



**OSTRAS DO GÊNERO *Crassostrea* COMO BIOINDICADORES DE POLUIÇÃO
AQUÁTICA NA ILHA DE SÃO LUÍS – MA**

ELIANE BRAGA RIBEIRO

São Luís – MA

2015

ELIANE BRAGA RIBEIRO

**OSTRAS DO GÊNERO *Crassostrea* COMO BIOINDICADORES DE POLUIÇÃO
AQUÁTICA NA ILHA DE SÃO LUÍS – MA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós –
Graduação em Ciência Animal da Universidade
Estadual do Maranhão - UEMA como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Neide Costa

Co-orientadora: Profa. Dra. Raimunda Nonata Fortes
Carvalho Neta

São Luís – MA

2015

Ribeiro, Eliane Braga.

Ostras do gênero *Crassostrea* como bioindicadores de poluição aquática na Ilha de São Luís – MA / Eliane Braga Ribeiro – São Luís, 2015.

77 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2015.

Orientador: Profa. Francisca Neide Costa

Co-orientador: Profa. Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta

1.Molusco bivalve. 2.Biomarcadores. 3.Marisqueiros. 4. Qualidade microbiológica. I.Título

CDU: 639.411:579

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em: ____/____/____ pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Professora Dra. Lúcia Maria Coelho Alves (UEMA)

1º membro

Professora Dra. Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta (UEMA)

2º Membro

Professora Dra. Francisca Neide Costa (UEMA)

Orientadora

*Entrega o teu caminho ao Senhor, confia Nele,
e Ele tudo fará.
(Salmo 37:5)*

A Deus, a minha Família e Amigos, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, pois todas as conquistas e realizações dependem da sua permissão.

A minha família em especial minha mãe Raimunda e ao meu irmão George por todo amor, apoio e confiança a mim, dedicados.

A professora Francisca Neide Costa por ter aceitado ser a minha orientadora, pelos conhecimentos ensinados e atenção a mim disponibilizada.

A professora Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta por ser a minha co-orientadora e sempre depositar em mim confiança e me incentivar desde a graduação, agradeço pelos ensinamentos, atenção e amizade que sempre a mim dedicou.

A UEMA por muito ter contribuído na minha formação, pelo espaço, estrutura, equipamentos e todas as instalações físicas disponibilizadas e ajuda de custo disponibilizada.

Aos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Água, de Físico-Química dos Alimentos, de Pesca e Ecologia Aquática e de Patologia Molecular.

Agradeço a coordenação e aos professores do Programa de Pós - graduação em Ciência Animal e também ao mestrado em Recursos Aquáticos e Pesca, os quais muito contribuíram para o meu aperfeiçoamento técnico e profissional.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo durante o período do mestrado.

A FAPEMA pela concessão do auxílio financeiro à pesquisa por meio do Edital Universal 2013.

Quero deixar um grande agradecimento a todos os integrantes do GEMVESP, aos amigos e companheiros, que me apoiaram e auxiliaram direta e indiretamente para realização desta pesquisa, seja em atividades em campo e/ou no laboratório: Luciana (e a sua família, especialmente a D. Rosa) Míryan, D. Ruthe, Isabella, Arlene, Éricka, Rafael, Lygia, Rosiclea, profa. Lúcia, prof. Felício, Monique, Célia e Osmar.

A todos os amigos e colegas de turma do mestrado pela amizade e companheirismo. Ao querido Francisco por seu apoio e carinho ao longo do mestrado.

A todos os funcionários e colaboradores desta instituição, em destaque a Fran, Juliana, Silvana, sr. Agnaldo e Nilson, D. Socorro, as estagiárias Gabriela e Carol.

Aos marisqueiros que muito colaboraram ao participar desta pesquisa, seja respondendo ao questionário, seja realizando as coletas de ostras e de água.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma participaram, contribuíram e me ajudaram a concretizar esta abençoada pesquisa.

RIBEIRO, E. B. **Ostras do gênero *Crassostrea* como bioindicadores de poluição aquática na Ilha de São Luís – MA.** [*Crassostrea* genus oysters as water pollution bioindicators on the island of Sao Luis - MA.]. 2015. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2015.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo utilizar biomarcadores bioquímicos associados à análise microbiológica para avaliar ostras do gênero *Crassostrea* como indicador de poluição aquática, além de analisar a qualidade microbiológica da água e questões socioeconômicas e higienicossanitárias sobre os marisqueiros de ostras. Para tanto, foram analisadas no período de dezembro de 2013 a janeiro de 2015, 64 amostras de água dos locais de extração de ostras e 64 amostras de ostras do gênero *Crassostrea* coletadas em municípios da Ilha de São Luís - MA para quantificação da atividade enzimática dos biomarcadores bioquímicos glutaciona-s-transferase (GST) e catalase (CAT) por meio de espectrofotometria. Para avaliação da qualidade higienicossanitária das ostras foram utilizados métodos analíticos oficiais para determinação do Número Mais Provável - NMP de Coliformes totais e termotolerantes, quantificação de bactérias aeróbias mesófilas e pesquisa de *Aeromonas* spp. Para a determinação de Coliformes totais e *E. coli* nas amostras de água foi utilizada a técnica do substrato enzimático cromogênico e fluorogênico ONPG/MUG. Paralelamente, foram entrevistados 19 marisqueiros utilizando-se questionário semiestruturado abordando questões socioeconômicas e de percepção higienicossanitária. Os resultados indicaram que no período chuvoso e de estiagem a atividade da enzima glutaciona s-transferase foi maior nas ostras do Porto do Cumbique. Enquanto para as ostras da área do Porto do Pau Deitado, essa atividade foi quase nula no período chuvoso. Para a atividade da enzima catalase os maiores níveis ocorreram nas ostras do Porto do Cumbique, nos dois períodos (chuvoso e estiagem), Cais da Raposa no período chuvoso, seguido de Porto do Braga no período de estiagem. Em relação a água, 100% das amostras analisadas, em ambos os períodos, apresentaram contaminação por Coliformes totais (Ct) e *E. coli*, 69% das amostras de ostras apresentaram Ct, 47% Coliformes termotolerantes (CT) e 8,33% de *E. coli* no período chuvoso. Enquanto no período de estiagem 57% das ostras apresentaram Ct, 39% CT e 21,42% *E. coli*. Além disso, 47% das amostras de ostras estavam contaminadas por bactérias do gênero *Aeromonas*, sendo todas confirmadas para a espécie *A. hydrophila*. As contagens de bactérias heterotróficas mesófilas variaram de $8 \times 10^2 \pm 6 \times 10^2$ a $2,8 \times 10^4 \pm 4,7 \times 10^4$. Quanto a aplicação dos questionários

observou-se que os marisqueiros pertenciam exclusivamente ao sexo masculino com média estimada de 33 anos de idade, sendo a maior parte proveniente de outros municípios maranhenses que não fazem parte da Ilha de São Luís. A maioria possui ensino fundamental incompleto, são casados ou possuem união estável. Possuem pouca noção sobre os cuidados higiênicos que devem ser adotados para a comercialização das ostras. Os dados obtidos sugerem que a alteração da atividade enzimática da glutathione s-transferase nas ostras analisadas é um indicativo de efeito adverso de contaminantes carregados para os corpos hídricos na Ilha de São Luís, principalmente na área do Porto do Pau Deitado. Essas ostras estão com a qualidade higienicossanitária inadequada para o consumo e podem ser um importante veículo de patógenos de origem alimentar, como *A. hydrophila* e *E. coli*. A água dos locais de coleta de ostras está dentro dos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação vigente. A atividade extrativista de coleta de ostra representa uma importante fonte de renda para a comunidade, entretanto é realizada sem recursos tecnológicos e por método artesanal.

Palavras-chave: molusco bivalve, biomarcadores, marisqueiros, qualidade microbiológica.

RIBEIRO, E. B. *Crassostrea* genus oysters as water pollution bioindicators on the island of São Luís - MA. [Ostras do gênero *Crassostrea* como bioindicadores de poluição aquática na Ilha de São Luís – MA.]. 2015. 77f. Dissertation (Master of Animal Science) - University of Maranhão, São Luís, 2015.

ABSTRACT

This study aimed to use biochemical biomarkers associated with microbiological analysis to assess gender *Crassostrea* oysters as water pollution indicator, in addition to analyzing the microbiological quality of water and socioeconomic and hygienic sanitary issues on oyster seller. Thus, we analyzed in december 2013 to january 2015, 64 water samples of 64 oysters and oyster *Crassostrea* genus sample extraction sites collected in municipalities of São Luís Island - MA to quantify the enzymatic activity of biochemical biomarker glutathione-s-transferase (GST) and catalase (CAT) by spectrophotometry. To evaluate the quality of hygienic sanitary oysters were used official analytical methods for determination of total coliforms and thermotolerant Most Probable Number - MPN, quantification of mesophilic aerobic bacteria and research *Aeromonas* spp. For the determination of total Coliforms and *E. coli* in water samples was used the technique of chromogenic and fluorogenic enzyme substrate ONPG / MUG. At the same time, we interviewed 19 oyster seller using semi-structured questionnaire addressing socioeconomic and hygienic sanitary perception issues. The results indicated that in the rainy season and the dry season the activity of glutathione s-transferase enzyme was higher in oysters of the Port of Cumbique. As for the oysters of the Port of Pau Laying area, this activity was almost nil during the rainy season. For the catalase enzyme activity the highest levels occurred in oysters of the Port of Cumbique, in both periods (wet and dry), Cais da Raposa in the rainy season, followed by Port of Braga in the dry season. In relation to water, 100% of the samples analyzed in both periods, showed levels of total Coliforms (Ct) and *E. coli*, 69% of oyster samples showed Ct, 47% thermotolerant coliforms (CT) and 8.33% *E. coli* in the rainy season. While in the dry season 57% of the oysters showed Ct, CT 39% and 21,42% *E. coli*. In relation to water, 100% of the samples analyzed in both periods, showed levels of total coliforms (Ct) and *E. coli*, 69% of oyster samples showed Ct, 47% thermotolerant coliforms (CT) and 8.33% *E. coli* in the rainy season. Furthermore, 47% of the samples of oysters were contaminated by bacteria of the genus *Aeromonas*, and all confirmed for *A. hydrophila*. The counts of heterotrophic bacteria mesophilic ranged from $8 \times 10^2 \pm 6 \times 10^2$ to $2,8 \times 10^4 \pm 4,7 \times 10^4$. As the questionnaires

showed that the oyster seller belonged exclusively to men with estimated average of 33 years old, most of it from other Maranhão municipalities that are not part of the São Luís Island. Most have incomplete primary education, are married or in a stable relationship. They have little idea about the hygienic care to be adopted for the marketing of oysters. The data obtained showed that the change of enzymatic activity of glutathione s-transferase in oysters analyzed is indicative of adverse effects of contaminants carted to the water bodies in São Luís Island, especially in the area of the Port of Pau Laying. These oysters are with inadequate higienicossanitária quality for consumption and can be an important vehicle for foodborne pathogens such as *A. hydrophila* and *E. coli*. The water of oyster collection sites are within the microbiological standards set by law. The oyster collection mining activity is an important source of income for the community, but is performed without technological resources and artisan method.

Key words: bivalve mollusk, biomarkers, oyster seller, microbiological quality.

LISTA DE TABELAS

p.

- Tabela 1**- Determinação de Coliformes totais (Ct) e pesquisa de *Escherichia coli* em água de quatro pontos de coleta de ostras do gênero *Crassostrea* nos períodos chuvoso e de estiagem na Ilha de São Luís – MA, 2014..... 40
- Tabela 2** - Média geométrica e percentil 90% das contagens de *E. coli* em amostras de água de quatro pontos de coleta de ostras do gênero *Crassostrea* na Ilha de São Luís – MA, fevereiro a outubro/2014.42
- Tabela 3** - Valores de salinidade em águas coletadas nos quatros pontos de extração de ostras, Ilha de São Luís, 2014.42
- Tabela 4** – Determinação de Número Mais Provável (NMP) de Coliformes totais (Ct), termotolerantes (CT) e pesquisa de *Escherichia coli* em amostras de ostras do gênero *Crassostrea* coletadas nos períodos chuvoso e de estiagem em quatro pontos de extração na Ilha de São Luís – MA, 2014..... 43
- Tabela 5** - Contagem de bactérias heterotróficas mesófilas em ostras do gênero *Crassostrea* coletadas nos períodos chuvoso e de estiagem em quatro pontos de extração na Ilha de São Luís – MA, 2014.....47

LISTA DE FIGURAS

p.

Figura 1 - Localização dos pontos de coleta na Ilha de São Luís – MA, Brasil, 2014.....	31
Figura 2 - Áreas de depósitos naturais de ostras identificados para realização das coletas. A) Porto do Braga; B) Cais da Raposa (Município de Raposa-MA); C) Porto do Cumbique; D) Porto do Pau Deitado (Município de Paço do Lumiar - MA), 2014.	32
Figura 3 - Atividade enzimática da glutathione s-transferase (GST) em ostras do gênero <i>Crassostrea</i> no período chuvoso e de estiagem, Ilha de São Luís-MA, 2014.....	38
Figura 4 - Atividade enzimática da catalase (CAT) em ostras do gênero <i>Crassostrea</i> no período chuvoso e de estiagem, Ilha de São Luís-MA, 2014.	39
Figura 5 - Percentual de amostras de ostras do gênero <i>Crassostrea</i> analisadas e contaminadas por <i>A. hydrophila</i> , coletadas nos períodos chuvoso e de estiagem em quatro pontos de extração na Ilha de São Luís – MA, 2014.	46
Figura 6 - Faixa etária dos marisqueiros de ostras entrevistados, Ilha de São Luís - MA, 2014.	49
Figura 7 - Origem dos marisqueiros de ostra, Ilha de São Luís - MA, 2014.	49
Figura 8 - Percentual dos principais cuidados higiênicos informados pelos marisqueiros para comercializar as ostras, Ilha de São Luís, 2014.....	52

SUMÁRIO

	p.
1	INTRODUÇÃO 15
2	OBJETIVOS 17
2.1	Geral 17
2.2	Específicos 17
3	REVISÃO DE LITERATURA 18
3.1	Poluição aquática e suas consequências para a biota..... 18
3.2	Moluscos bivalves 19
3.2.1	Moluscos bivalves em biomonitoramento da poluição aquática..... 21
3.3	Biomarcadores 23
3.3.1	Biomarcadores bioquímicos: glutathione s-transferase e catalase 24
3.4	O consumo de moluscos bivalves e a relação com a saúde pública..... 26
3.5	Microrganismos indicadores de qualidade higienicossanitária 28
3.5.1	Coliformes totais, Coliformes termotolerantes e <i>Escherichia coli</i> 28
3.5.2	<i>Aeromonas</i> 29
3.6	Uso combinado de biomarcadores e microrganismos indicadores de qualidade em moluscos bivalves..... 30
4	MATERIAL E MÉTODOS 31
4.1	Área de estudo 31
4.2	Identificação dos pontos de coleta de ostras 31
4.3	Obtenção das amostras 32
4.4	Preparação das amostras 33
4.5	Análise de ostras utilizando biomarcadores 33
4.6	Análises microbiológicas das amostras de ostras e água 34
4.6.1	Determinação do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes totais e Coliformes termotolerantes em ostras 34
4.6.2	Pesquisa de <i>Escherichia coli</i> nas amostras de ostras 34
4.6.3	Pesquisa de <i>Aeromonas</i> spp. 35
4.6.4	Contagem de microrganismos heterotróficos mesófilos 36
4.6.5	Determinação do NMP de Coliformes totais e pesquisa de <i>Escherichia coli</i> nas amostras de água 36
4.7	Obtenção dos dados socioeconômicos e higienicossanitários 36
4.8	Obtenção de parâmetros abióticos..... 37

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	Biomarcadores bioquímicos em ostras coletadas na Ilha de São Luís	37
5.2	Aspectos microbiológicos de ostras e de amostras de água dos locais de coleta na Ilha de São Luís	40
5.3	Aspectos socioeconômicos dos marisqueiros de ostras	48
5.3.1	Procedimentos desde a captura até a comercialização	51
6	CONCLUSÕES	53
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
	REFERÊNCIAS	55
	APÊNDICES.....	70
	ANEXOS	77

1 INTRODUÇÃO

O litoral maranhense é rico em áreas estuarinas, favoráveis ao desenvolvimento de diversos recursos pesqueiros como peixes, sururu, sarnambi e ostras. A ostra é um alimento de grande valor nutricional, principalmente por 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).

Este molusco bivalve, além de ser uma importante reserva alimentícia, representa uma considerável fonte de renda para as comunidades pesqueiras do Maranhão (MONTELES; FUNO & CASTRO, 2010). Nessa região, as ostras são geralmente consumidas cruas. Essa característica torna esse alimento um risco para a saúde humana, pois como os demais bivalves apresentam hábito alimentar filtrador. Devido à contaminação de seu hábitat (marinho ou estuarino), estes organismos atuam como bioindicadores do estado de qualidade do local em que se encontram (GÓMEZ-COUSO et al., 2003).

Situados em regiões costeiras, os estuários frequentemente são alvos de grande atividade antropogênica, sendo, portanto suscetíveis aos impactos decorrentes destas atividades. As principais fontes de impacto ambiental em estuários são: o escoamento de esgoto proveniente de áreas urbanas, a liberação de diversos produtos químicos (orgânicos e inorgânicos) pela atividade industrial, a agricultura e o fluxo de embarcações, atividade a partir da qual podem ocorrer vazamentos acidentais de petróleo e derivados, combustíveis e outros produtos transportados por via marítima (KENNISH, 1991).

Com isso, observa-se a necessidade de estudo, para melhor conhecer os efeitos da contaminação sobre os organismos aquáticos residentes, como as ostras, bem como as suas condições higienicossanitárias no litoral maranhense. Os possíveis efeitos de contaminantes nos animais aquáticos podem ser avaliados por meio da utilização de biomarcadores, que são respostas biológicas ou efeitos, ainda em fase inicial nos organismos, provocados pelos poluentes (MARTINEZ & CÓLUS, 2002).

Os biomarcadores bioquímicos mais utilizados em organismos aquáticos do litoral maranhense são as enzimas glutathione s-transferase e a catalase (CARVALHO-NETA, 2010). A catalase tem sido utilizada como biomarcador bioquímico em peixes de regiões contaminadas por ser uma enzima antioxidante importante na decomposição de peróxido de

hidrogênio produzido em quantias maiores durante o processo de biotransformação (VENTURA et al., 2002).

A glutationa-s-transferase é um biomarcador bioquímico envolvido na desintoxicação celular de compostos eletrofílicos, sendo importante na proteção contra câncer e outras doenças degenerativas decorrentes da exposição a ambientes contaminados (BABBITT, 2000).

Já os aspectos relacionados à qualidade higiênica e sanitária em organismos aquáticos utilizados na alimentação humana, podem ser analisados por meio de análises microbiológicas com metodologias padronizadas para identificação dos diversos tipos de microrganismos patogênicos.

Huss (1997) esclarece que existem dois grupos de bactérias de importância para a saúde humana que podem contaminar os produtos de origem marinha: a) aqueles presentes no ambiente como *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* e *Listeria monocytogenes*; b) e bactérias da família *Enterobacteriaceae* como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., e *Escherichia coli* que estão presentes no meio, devido a contaminação por dejetos humanos.

O consumo de moluscos filtradores *in natura* representa um risco de toxinfecção, pois não se sabe quais bactérias e em quais níveis quantitativos estariam presentes nesses animais (VIEIRA, 2004).

No Brasil, não existe legislação específica voltada para a avaliação microbiológica de moluscos bivalves consumidos crus. A Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 12/2001 contempla somente moluscos bivalves cozidos, industrializados resfriados ou congelados. Dessa forma, os cuidados com estes alimentos devem ser redobrados e os consumidores devem ser informados sobre a qualidade higiênica e sanitária e ao perigo de se consumir alimentos *in natura*.

Considerando a importância das ostras como recurso alimentar, aliada a necessidade de fortalecer o conhecimento sobre a utilização de moluscos bivalves como bioindicadores de qualidade, buscou-se desenvolver estudos a partir da metodologia baseada em biomarcadores bioquímicos, associados à análise microbiológica para a avaliação de ostras do gênero *Crassostrea* como bioindicadores de poluição aquática na Ilha de São Luís - MA.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Utilizar biomarcadores bioquímicos associados a análise microbiológica para avaliar o potencial de ostra (*Mollusca, Bivalvia*) como bioindicador de poluição aquática.

2.2 Específicos

- Monitorar a resposta de biomarcadores de estresse ambiental sobre ostras utilizando as enzimas glutathione s-transferase e catalase;
- quantificar a população bacteriana de Coliformes totais e Coliformes termotolerantes em amostras de ostras;
- pesquisar *Escherichia coli* e *Aeromonas* spp. em amostras de ostras;
- realizar a contagem de bactérias heterotróficas mesófilas em amostras de ostras;
- determinar o Número Mais Provável de Coliformes totais e *E. coli* nas amostras de água oriundas das áreas de coleta de ostras;
- analisar o perfil socioeconômico dos marisqueiros de ostras e os procedimentos higienicossanitários desde a captura até a comercialização.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Poluição aquática e suas consequências para a biota

A Política Nacional do Meio Ambiente (Lei n.º 6938/1981, artigo 3º, inciso III) define poluição, como sendo a degradação da qualidade ambiental resultante de atividades que direta ou indiretamente: a) prejudiquem a saúde, a segurança e o bem-estar da população; b) criem condições adversas às atividades sociais e econômicas; c) afetem desfavoravelmente a biota; d) afetem as condições estéticas ou sanitárias do meio ambiente; e) lancem matérias ou energia em desacordo com os padrões ambientais estabelecidos (BRASIL, 1991).

A poluição aquática, especialmente em ambientes estuarinos, é considerado um problema ambiental crítico por causa da variação de vários fatores abióticos (salinidade, temperatura, pH, oxigênio dissolvido) que impõem severas restrições para os organismos que vivem nestas áreas, além de alterar a biodisponibilidade dos poluentes e a sua toxicidade (MONSERRAT et al., 2007).

Os contaminantes químicos biodegradáveis, após algum tempo no ambiente, são decompostos pela ação de bactérias (detergentes, inseticidas, fertilizantes, petróleo); enquanto os contaminantes persistentes como o diclorodifeniltricloroetano (DDT) se mantêm por longo tempo no ambiente, podem causar a contaminação de peixes, crustáceos, moluscos e serem incorporados na cadeia alimentar, além de serem tóxicos para estes organismos (quando ultrapassam determinadas concentrações) (PEREIRA, 2004).

Os metais pesados (cádmio, cromo, mercúrio, níquel, chumbo) podem ser bioacumulados pela flora e fauna aquática e alguns agem combinando-se fortemente com proteínas dos seres vivos, provocando inibições em algumas enzimas e alterações no metabolismo das células; em peixes e moluscos, podem gerar mudanças adversas na sua morfologia e fisiologia, como lesões branquiais e a inibição das trocas gasosas (PEREIRA, 2004).

Microrganismos, como bactérias (Coliformes totais e Coliformes termotolerantes, principalmente *Escherichia coli*), vírus, fungos e leveduras introduzidos nos corpos de água, sobretudo através do lançamento de efluentes não tratados, podem ser acumulados nos tecidos de animais filtradores como os moluscos bivalves (ABESSA, 2012), o que pode desencadear algum agravo à saúde do organismo.

A vulnerabilidade dos ambientes aquáticos aos poluentes depende das propriedades físicas e químicas dos contaminantes e dos produtos resultantes de sua transformação; da concentração dos contaminantes no ecossistema; se a fonte poluidora é pontual ou difusa; da capacidade de resistência do ecossistema às alterações resultantes da presença dos contaminantes, como a capacidade tampão e a concentração de matéria orgânica dissolvida; da localização do ecossistema em relação ao sítio de lançamento dos contaminantes; da capacidade da biota armazenar a substância e biotransformá-la em um ou mais compartimentos do organismo (SILVA; CAMPOS & BOHM, 2013).

Os efeitos nocivos dos poluentes sobre os animais aquáticos podem ocorrer de forma rápida e direta ou de forma indireta após um longo período de tempo. Muitos poluentes podem ser absorvidos diretamente da água onde se encontram dissolvidos e assim concentrarem-se em espécies mais sensíveis, sem que haja relação com a teoria das cadeias alimentares (CARAPETO, 1999).

Para Silva, Campos & Bohm (2013) os efeitos deletérios sobre os recursos pesqueiros, se propagam pelos demais componentes dos ecossistemas, provocando modificações nas características e dinâmica das populações (reprodução, migração, restabelecimento e mortalidade), na estrutura e função das comunidades (alteração na diversidade de espécies, modificações na relação predador-presa) e na função do ecossistema (alterações nos processos de respiração e fotossíntese e, no fluxo de nutrientes).

Lucas & Beninger (1985) acrescentam que a presença de contaminantes no ambiente pode levar também à redução de reservas energéticas nos animais como um mecanismo compensatório à alta demanda de energia requerida pelos processos de detoxificação.

Dentre os organismos aquáticos que podem ser afetados pelos contaminantes, têm-se os moluscos bivalves, que representam um importante grupo faunístico capaz de bioacumular xenobiontes oriundos dos corpos aquáticos.

3.2 Moluscos bivalves

Os moluscos constituem o maior filo animal, sendo secundário apenas ao táxon Arthropoda. Existem cerca de 35.000 espécies extintas descritas e 100.000 espécies na fauna atual, porém estima-se de 50.000 a 150.000 em função da mesma espécie ter sido descrita com outro nome (RUPPERT; FOX & BARNES, 2005).

A existência dos moluscos é conhecida nos mais diversos ecossistemas, desde as fossas abissais até as mais altas montanhas, geleiras polares e regiões desérticas. Nesses ambientes diferenciados, os moluscos desenvolveram formas e hábitos de vida variados e altamente especializados, que vão desde predadores gigantes e habilidosos nadadores até pequenos herbívoros vermiformes rastejantes e sedentários, além de diminutos ecto e endoparasitas, comensais, filtradores sésseis, pelágicos, bentônicos, dentre outros (COLLEY; SIMONE & SILVA, 2012).

Considerando a classificação lineana tradicional, o filo Mollusca compõe-se das classes: *Aplacophora*, *Polyplacophora*, *Monoplacophora*, *Gastropoda*, *Cephalopoda*, *Bivalvia* e *Scaphopoda*. A classe *Bivalvia* possui cerca de 8.000 espécies, das quais 1.300 vivem em água doce e as demais são marinhas, variam de tamanho podendo ter 2 mm de comprimento até mais de um metro (RUPPERT; FOX & BARNES, 2005). Esta classe representada pelos berbigões, mexilhões, ostras, vieiras e teredos também é denominada de Pelecypoda que significa “pé em forma de machado” (BRUSCA & BRUSCA, 2007).

Assim, como os demais moluscos, os 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 et al., 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, na filtragem do alimento (fitoplâncton e matéria orgânica particulada), além das trocas gasosas (BRUSCA & BRUSCA, 2007).

Três grupos principais diferenciados pela natureza das brânquias e modos alimentares compõem a classe *Bivalvia*: os protobrânquios, considerados os mais primitivos, possuindo apenas um par de brânquias usadas para as trocas gasosas, vivendo, em parte, sob o sedimento não consolidado e sendo comedores de material depositado; os septibrânquios que são carnívoros especializados, capturam presas individuais usando mecanismo de sucção gerado pela cavidade do manto; e os lamelibrânquios (que significa “brânquia lamelar”) que abrangem a maioria das espécies de bivalves, são comedores seletivos de depósito, como os protobrânquios, e também comedores de suspensão, especializados em partículas alimentares diminutas (microfagos) (RUPPERT & BARNES, 1996; RUPPERT; FOX & BARNES, 2005).

A seleção natural favoreceu os lamelibrânquios (com suas grandes e eficientes brânquias capazes de filtrar o alimento) e eles passaram por uma grande radiação adaptativa ampliando as possibilidades de explorar a maioria dos biótopos adequados para moluscos sedentários e assim dominarem a fauna de bivalves (RUPPERT & BARNES, 1996; RUPPERT; FOX & BARNES, 2005).

Na classe *Bivalvia*, encontra-se a ordem *Ostreoida*, que compreende a família *Ostreidae* (RUPPERT, FOX & BARNES, 2005). Nesta família incluem-se três subfamílias: *Ostreinae*, *Crassostreinae* e *Lophinae*, totalizando quinze gêneros e quarenta espécies (AMARAL; RIZZO & ARRUDA, 2006). Os representantes dessa família caracterizam-se por habitarem mares tropicais e temperados, tendo maior diversidade em águas quentes e viverem cimentados em substratos consolidados. No Brasil têm-se o registro de três gêneros da família *Ostreidae*: *Ostrea* (Linné, 1758), *Crassostrea* (Sacco, 1897) e *Lopha* (Roding, 1798) (AMARAL; RIZZO & ARRUDA, 2006).

O gênero *Crassostrea* abrange espécies economicamente importantes, que podem ocorrer em zonas estuarinas de baixa salinidade, como as espécies brasileiras *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) e *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) e em áreas de salinidade normal, a ostra japonesa *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) que é difundida e cultivada em vários países (MALOUF & BREESE, 1977).

No Brasil os representantes do gênero *Crassostrea* são popularmente conhecidos como ostras do mangue e constituem depósitos (bancos) nas regiões intertidal e subtidal, tanto em substratos rochosos quanto nas raízes de *Rhizophorae mangle* (Linné, 1753) (ABSHER, 1989).

Os moluscos do gênero *Crassostrea* têm sido muito utilizados em estudos de biomonitoramento de poluição aquática, especialmente, pela sua fisiologia de organismos filtradores.

3.2.1 Moluscos bivalves em biomonitoramento da poluição aquática

O uso de ostras e mexilhões em estudos de biomonitoramento em águas costeiras já é reconhecido desde 1975 e foram apontados em programas internacionais de monitoramento de poluentes no ambiente marinho (GALVÃO, 2009; HAMZA-CHAFFAI, 2014).

Desse período até a atualidade, diversos estudos vêm evidenciando a capacidade filtradora e bioacumuladora dos bivalves como um mecanismo que permite demonstrar as

condições de sanidade do ambiente (VIEIRA, 2004; LEAL & FRANCO, 2008; GALVÃO, 2009; RAMOS et al., 2010). Esta característica estrutural dos bivalves responsável pela respiração e filtragem do alimento (acima de 400 litros/dia) faz com que tenham um rápido crescimento. Ao mesmo tempo permite o armazenamento de uma microbiota bacteriana diversificada, podendo atuar como portadoras passivas de agentes patogênicos ao ser humano quando mantidas em águas poluídas, razão pela qual são usados como bioindicadores da qualidade do ecossistema marinho (BARNABÉ, 1996; IRIARTE & RENGEL, 1997; BURKHADT & CALCII, 2000).

Bioindicadores ou indicadores biológicos são definidos como sendo qualquer espécie, comunidade ou processo biológico empregado na avaliação da qualidade do ambiente, e no entendimento de como este se altera ao longo do tempo (HOLT & MILLER, 2010). Em outra definição, um organismo vivo é considerado como bioindicador, quando apresenta alguma reação que pode ser identificada e relacionada com as diferenças ou alterações apresentadas no meio em que ele habita (LIJTEROFF; LIMA & PRIERI, 2009).

Alguns fatores devem ser considerados para escolha de uma espécie como bioindicadora: a representatividade na área de estudo; o hábito preferencialmente sésil ou de baixa mobilidade, constituindo assim populações fixas para que sua exposição aos contaminantes reflita as condições da área em estudo; possuir preferencialmente tamanho grande, ser taxonomicamente definido e de fácil identificação por não especialistas, de acessível coleta em todas as estações do ano, apresentar características ecológicas conhecidas e ter a possibilidade de uso em estudos laboratoriais (RADTKE, 1979; BUSS; BAPTISTA & NESSIMIAN, 2003).

Tais atributos são encontrados em espécies de moluscos bivalves marinhos como as ostras. Além dessas características, soma-se a capacidade de se alimentarem pelo processo de filtração da água. Carvalho (2001) e Nascimento (2011) esclarecem que esse mecanismo de alimentação proporciona a absorção de toxinas, poluentes químicos e biológicos, inclusive metais pesados e microrganismos como protozoários, bactérias e vírus presentes na água. Para Cunningham (1979) os bivalves marinhos podem acumular, em seus órgãos e tecidos, contaminantes em uma concentração mais elevada, se comparada com a do local de contaminação.

Dentre as formas empregadas em estudos de biomonitoramento os bivalves têm sido recomendados como organismos sentinela ou bioindicador. Nessa estratégia a avaliação ocorre através da análise da resposta bioquímica (biomarcadores) que os organismos

residentes manifestam decorrentes da exposição aos contaminantes no ambiente (ALMEIDA et al., 2007).

3.3 Biomarcadores

O emprego de biomarcadores tem sido considerado uma ferramenta adequada para determinar os danos causados por um determinado agente tóxico (NASCIMENTO, 2006; ALMEIDA et al., 2007; CARVALHO-NETA & ABREU-SILVA, 2010; HAMZA-CHAFFAI, 2014).

Geralmente o termo “biomarcador” é usado em um sentido abrangente, incluindo praticamente qualquer medição que reflete uma interação entre um sistema biológico e um perigo potencial, que pode ser químico, físico ou biológico (OOST; BEYER & VERMEULEN, 2003).

Freire et al. (2008), Carvalho-Neta & Abreu-Silva (2010) definem biomarcadores como respostas biológicas mensuráveis que revelam a exposição ou efeito de um dado organismo aos compostos químicos estranhos (xenobióticos). Acrescentam ainda, que essas respostas biológicas podem ser parâmetros bioquímicos, fisiológicos, morfológicos ou comportamentais, alterados.

Oost, Beyer & Vermeulen (2003) explanam que em 1987 a Comissão dos Marcadores Biológicos do Conselho Nacional de Pesquisa e em 1993 o Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) realizaram trabalhos categorizando os biomarcadores em três classes:

a) Biomarcadores de exposição - abrangem a detecção e a medição de uma substância exógena, ou o seu metabólito ou o produto, proveniente de uma interação entre um xenobiótico e a molécula alvo ou célula que é medido em um compartimento dentro de um organismo;

b) Biomarcadores de efeito - abrangem alterações bioquímicas mensuráveis, alterações fisiológicas ou outras dentro dos tecidos ou fluidos corporais de um organismo e que podem ser reconhecidas e associadas a um comprometimento da saúde ou possível doença.

c) Biomarcadores de suscetibilidade - indicam a capacidade inerente ou adquirida de um organismo para responder ao desafio de exposição ao xenobiótico, incluindo fatores genéticos e alterações nos receptores que alteram a sensibilidade desse organismo.

As vantagens relativas ao uso de biomarcadores residem, na maioria dos casos, em menor custo, maior rapidez e facilidade das técnicas quando comparadas às tradicionais análises químicas, além de detectar mudanças antes do nível populacional (GALLOWAY et al., 2002). Trata-se de uma ferramenta adequada na predição dos efeitos deletérios por possuírem alta sensibilidade, permitindo que sejam tomadas medidas de biorremediação antes que ocorram danos ambientais em maior escala e que sejam irreversíveis (FREIRE et al., 2008).

As enzimas antioxidantes estão entre os principais biomarcadores bioquímicos utilizados em organismos aquáticos para avaliar a exposição aos contaminantes ambientais (CARVALHO-NETA & ABREU-SILVA, 2013).

3.3.1 Biomarcadores bioquímicos: glutathione s-transferase e catalase

As enzimas antioxidantes são essenciais para o funcionamento dos sistemas biológicos. As alterações na atividade enzimática podem ser determinadas utilizando partes moles do organismo em análise espectrofotométrica.

Os principais tecidos de moluscos bivalves utilizados em estudos de impacto ambiental são as brânquias e a glândula digestiva (divertículo digestivo). As brânquias são superfícies que interagem diretamente com as substâncias dissolvidas na água e refletem exposições recentes, consideradas agudas. A glândula digestiva reflete exposição com maior período de tempo (crônica). No entanto, o músculo é também de grande relevância, pois é uma porção comestível do bivalve, e durante a exposição no ambiente, pode armazenar elementos químicos (GALVÃO et al., 2009).

Diversos trabalhos têm apresentado a relação entre a exposição de contaminantes e a atividade de enzimas antioxidantes como biomarcadores em moluscos bivalves. Canesi et al. (1999) analisaram brânquias e glândulas digestiva de mexilhões (*Mytilus galloprovincialis* Lam.), após a exposição ao cobre (0,6 mM) observaram um decréscimo no teor total da enzima glutathione s-transferase. Mexilhões (*Dreissena polymorpha*) sujeitos a metais e a bifenilos policlorados (composto orgânico persistente) apresentaram inibição da atividade de glutathione peroxidase (FARIA et al., 2009). Zanette et al. (2011) verificaram forte influência da salinidade nas respostas de biomarcadores (CAT e GST) em ostras *Crassostrea gigas* expostas a óleo diesel.

Zanette et al. (2008) avaliaram a catalase em tecidos (brânquias e glândula digestiva) de ostras *Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea gigas* coletadas em locais com recepção de descarga de esgoto doméstico (Santa Catarina - Brasil) e verificaram que a atividade da catalase foi maior em ambos os tecidos de *C. rhizophorae*, enquanto que em *C. gigas* somente nas brânquias, sendo a primeira espécie considerada mais adequada para o monitoramento do efluente.

As enzimas são bastante empregadas como biomarcadores bioquímicos, uma vez que o aumento ou a inibição da sua atividade pode indicar algum tipo de resposta ao estresse ambiental (COGO et al., 2009). O emprego da atividade enzimática deve-se ao fato dos compostos tóxicos, que apresentam uma meia-vida relativamente longa, possuírem alta afinidade por pares de elétrons encontrados nos aminoácidos que formam as enzimas (BERTIN & AVERBECK 2006; IVANINA et al., 2008).

Os poluentes ambientais geralmente causam um aumento nos processos peroxidativos no interior das células, fazendo com que haja estresse oxidativo (WINSTON & GIULIO 1991; CHEUNG et al., 2001; NUSETTI et al., 2001). Nesse processo, ocorre um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, gerando excessiva quantidade de radicais livres (e/ou espécies reativas de oxigênio - ERO) ou a diminuição na sua remoção (BARBOSA et al., 2010). Os radicais livres produzidos pela presença de substâncias tóxicas no organismo reagem com lipídeos, proteínas ou ácidos nucleicos e resultam em diversas injúrias bioquímicas ou genéticas (COGO et al., 2009).

Os biomarcadores bioquímicos mais utilizados atualmente em organismos aquáticos da costa maranhense são as enzimas glutathione s-transferase (GST) e a catalase (CAT) (CARVALHO-NETA & ABREU-SILVA, 2010). Essas enzimas fazem parte do sistema de defesa antioxidante, atuando no processo de detoxificação de compostos tóxicos formados nos seres vivos, e são consideradas importantes ao permitirem a sobrevivência de organismos em ambientes impactados (COGO et al., 2009).

A glutathione-s-transferase constitui a maior família de enzimas detoxificantes (PRADE et al., 1997). Dentre as suas diversas funções, participa no processo de desintoxicação celular e correção dos efeitos deletérios de contaminantes como drogas, herbicidas, pesticidas, compostos químicos carcinogênicos e poluentes ambientais (HAYES & PULFORD, 1995).

A catalase atua na remoção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é convertido em oxigênio molecular (O_2) e água (H_2O). O peróxido de hidrogênio é um produto secundário do

metabolismo celular, sendo produzido em maiores quantidades durante o processo de biotransformação, em excesso produz danos, porque ocasiona a formação de radicais livres (SILVA et al., 2005).

Na detoxificação enzimática ocorre a transformação (biotransformação) dos compostos estranhos deletérios ao organismo, em uma substância que apresenta maior solubilidade em água, além de uma menor toxicidade. Estes metabólitos são transportados para o exterior da célula e então excretados (HUBER et al., 2008).

Processos de detoxificação em organismos aquáticos merecem especial atenção, principalmente naqueles táxons destinados a alimentação, como os moluscos bivalves, os quais bioacumulam xenobiontes diversos oriundos do ambiente em que são encontrados.

3.4 O consumo de moluscos bivalves e a relação com a saúde pública

A ostra é considerada um organismo com importantes características nutricionais devido ao seu teor de minerais (fósforo, cálcio, ferro e iodo), glicogênio, vitaminas (A, B1, B2, C e D), proteínas, além de possuir baixo valor calórico, em comparação com outras carnes (CHRISTO, 2006; PARISENTI; TRAMONTE & ARELLANO, 2010).

Em vários Estados do Brasil, as ostras garantem a subsistência de parte da comunidade pesqueira, tanto em termos de consumo, como de comercialização (RAMOS et al., 2010). O consumo desse molusco ocorre principalmente em regiões litorâneas (VIEIRA, 2004), a exemplo da Ilha de São Luís, localizada na costa maranhense, onde é consumido por turistas e população local.

No entanto, apesar da sua relevância nutricional e comercial, pode ser um alimento potencialmente disseminador de doenças para a população consumidora. O risco existe por conta das ostras serem bioacumuladoras de microrganismos nocivos e demais contaminantes presentes na água onde habitam. Essa propriedade é agravada devido à sua forma de consumo tradicional *in natura* (POTASMAN; PAZ & ODEH, 2002).

Ostras consumidas cruas e originadas a partir de áreas contaminadas ou manipuladas em condições higienicossanitárias precárias aumentam o risco de doenças veiculadas por alimentos (PEREIRA et al., 2006).

Alguns estudos indicaram a presença de contaminantes químicos e biológicos em moluscos bivalves. Cavalcanti (2003) realizou o monitoramento dos níveis de elementos traço (Hg, Mn, Zn, Cu e Fe), em ostras comercializadas na praia de Boa Viagem, Recife - PE,

durante o período de um ano, onde verificou que o mercúrio foi o principal contaminante encontrado. Gonçalves, Freire & Nascimento-Neto (2007) analisaram ostras *Crassostrea rhizophorae* coletadas no Rio Ceará e Rio Cocó – Ceará e verificaram a concentração Cd acima de 1µg/g, Cr com valores superiores a 0,10 µg/g e Zn com valores acima de 50 µg/g quando comparadas com as normas estabelecidas pelo Ministério da Saúde.

Leal & Franco (2008) destacaram vários trabalhos envolvendo moluscos bivalves em ocorrência de surtos no Brasil e no mundo, como por exemplo: a) em uma região de Santa Catarina em que a comercialização e o consumo de moluscos bivalves (mexilhões) foram suspensos devido à contaminação, por algas nocivas, nos locais onde se encontravam; b) na China, 290 mil pessoas contraíram o vírus da hepatite e 47 faleceram, após a ingestão de mariscos; ocorrência de protozooses causadas por *Cryptosporidium* e *Giardia* presentes em diferentes espécies de moluscos bivalves.

Evangelista-Barreto et al. (2008) isolaram diversas espécies de *Aeromonas* (*A. caviae*, *A. eucrenophila*, *A. media*, *A. sobria*, *A. trota*, *A. veronii* bv. *sobria*, *A. veronii* bv. *veronii*) em amostras de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) de um leito natural no estuário do Rio Cocó na região da Sabiaguaba (Fortaleza, Ceará, Brasil). Pereira, Viana & Rodrigues (2007) isolaram bactérias do gênero *Vibrio* (*V. parahaemolyticus*, *V. carchariae*, *V. alginolyticus* e *V. vulnificus*) a partir de um estudo com quarenta amostras de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) servidas *in natura* em quinze restaurantes no Rio de Janeiro.

Sande et al. (2010) pesquisaram os indicadores tradicionais de poluição (Coliformes totais e Coliformes termotolerantes), além de enterobactérias em amostras de água e de moluscos bivalves *Crassostrea rhizophorae* e *Tagelus plebeius* extraídos nos rios Cachoeira e Santana (Ilhéus, Bahia) durante um trimestre, e isolaram 68 microrganismos, distribuídos em dez espécies, dentre elas, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* e *Shigella* sp.

A ingestão de alimentos crus ou minimamente cozidos e contaminados pode resultar em infecções ou intoxicações alimentares (BRAGA & FERREIRA, 2010). Welker et al. (2009) afirmam que as doenças transmitidas por alimentos (DTAs) constituem um grande problema de saúde pública, tanto no Brasil como nos demais países, sendo responsáveis por elevados custos econômicos e sociais. Estes autores destacam também que, de acordo com informações disponibilizadas pelo Ministério da Saúde, ocorreram mais de 3.400.000 internações por DTAs no Brasil, de 1999 a 2004, com uma média de 570 mil casos por ano.

3.5 Microrganismos indicadores de qualidade higienicossanitária

Microrganismos indicadores são grupos ou espécies de microrganismos, cuja presença no alimento ou na água, pode fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação fecal, presença de patógenos ou sobre a deterioração do recurso alimentar, além de indicar condições sanitárias inadequadas (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

Muitos microrganismos patogênicos podem contaminar os alimentos, alguns desses agentes são: bactérias (*Aeromonas* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium* spp., *Escherichia coli*, *Legionella* spp., *Leptospira* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella entérica*, *Shigella* spp., *Vibrio* spp. e *Yersinia* spp.); vírus (Adenovírus, Hepatite A, Poliovírus, Rotavírus); e protozoários (*Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp.) (HIRAI, 2013).

As bactérias podem desencadear infecções intestinais epidêmicas e endêmicas (febre tifoide, cólera, shigelose, salmonelose, leptospirose); os vírus podem provocar hepatites e infecções nos olhos; e os protozoários são responsáveis por várias infecções dentre elas amebíases e giardíases (PEREIRA, 2004).

Para Doyle, Beuchat & Montville (1997), o diagnóstico de microrganismos presentes interna ou externamente aos alimentos pode ser usado para avaliar segurança e a qualidade microbiológica dos mesmos. Acrescentam ainda, que a segurança é determinada pela ausência ou presença de patógenos ou suas toxinas, quantidade do inóculo, e o tempo de controle ou a destruição desses agentes.

Microrganismos como Coliformes totais e Coliformes termotolerantes, e os gêneros *Salmonella*, *Vibrio*, *Aeromonas* e *Staphylococcus* configuram-se como indicadores de qualidade sanitária de grande importância e são frequentemente pesquisados em alimentos de origem dulcícola ou estuarino (PEREIRA et al., 2006; CHRISTO et al., 2008; SANTOS & VIEIRA, 2013).

3.5.1 Coliformes totais, Coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*

Os coliformes constituem um grupo bacteriano da família *Enterobacteriaceae* cujos bacilos são Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase negativa, capazes de crescer na presença de sais biliares ou outros compostos ativos de superfície, com propriedades similares de inibição de crescimento, e que fermentam a lactose com produção de ácidos, aldeídos e gás a 35°C em 24-48 horas. Este grupo contém os

seguintes gêneros: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

Os Coliformes termotolerantes se referem às bactérias com capacidade de desenvolvimento e/ou fermentação da lactose com produção de gás em 44°-45°C em 24 horas. A principal espécie dentro desse grupo é a *Escherichia coli*, que tem como habitat primário o intestino do homem e de outros animais, enquanto os demais gêneros de termotolerantes podem estar presentes em vegetais e solo (FRANCO & LANDGRAF, 2003; VIEIRA, 2004).

A *E. coli* por não fazer parte da microbiota normal dos pescados, pode estar associada à contaminação fecal do local de captura (AGNESE et al., 2001) do acondicionamento, transporte e manipulação (VIEIRA, 2004). De acordo com Machado et al. (2001), determinação de coliformes, para avaliar a qualidade dos moluscos, amplia as possibilidades de normatização no cultivo desses bivalves, em relação a análise da água das áreas de cultivo.

Existem pelo menos cinco categorias de *E. coli* que causam a infecção intestinal por mecanismos diferentes, além de categorias associadas com infecções urinárias, meningites e outras infecções denominadas de extra-intestinais (SANTOS & VIEIRA, 2013).

3.5.2 *Aeromonas*

Aeromonas spp. são bactérias em forma de bastonetes, Gram-negativas, anaeróbias facultativas, sendo antes classificadas junto ao *Vibrio* spp. e *Plesiomonas shigelloides* na família *Vibrionaceae*, porém, estudos genéticos evidenciaram a necessidade de sua reclassificação em uma família própria, *Aeromonadaceae* (GHENGHESH et al., 2008).

Das 14 espécies descritas, apenas cinco são reconhecidas por serem patogênicas aos seres humanos: *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii* e *A. schubertii* (JANDA & ABBOTT, 1998). Em geral as espécies do gênero *Aeromonas* são os contaminantes mais comuns encontrados nos organismos marinhos, inclusive em peixes e ostras, uma vez que este gênero é primariamente autóctone de ambientes aquáticos (HÄNNINEN et al., 1997).

3.6 Uso combinado de biomarcadores e microrganismos indicadores de qualidade em moluscos bivalves

Desde 1970 vem sendo discutido que a utilização de metodologias tradicionais, baseadas apenas em análise das características físicas, químicas e bacteriológicas não são suficientes para avaliar a qualidade de um ambiente, pois apenas demonstram o momento em que foram realizadas, como uma fotografia de um rio, necessitando assim de um grande número de análises para a realização de um monitoramento temporal eficiente (BUSS; BAPTISTA & NEISSIMIAN, 2003).

A precisão dos estudos aumenta quando há integração dessas análises aos dados sobre os efeitos biológicos dos poluentes, sobretudo no caso de estresse oxidativo, uma via comum de toxicidade induzida por diversos tipos de contaminantes (VALAVANIDIS, 2006) que podem ser danosos para os organismos aquáticos, especialmente para aqueles que possuem baixa mobilidade e principalmente para os que são sésseis e filtradores, como os bivalves.

A análise de biomarcadores químicos (glutathione s-transferase e catalase) associada ao uso de parâmetros microbiológicos na água de cultivo e em tecidos de ostra (*Crassostrea* sp.) pode proporcionar maior base para a investigação, identificação dos estressores ambientais e seus efeitos, resultados mais concretos e confiáveis para subsidiar ações mitigatórias na área em estudo.

Considerando o enfoque da saúde humana é fundamental conhecer os efeitos deletérios da contaminação sobre os organismos que servem de alimento para o homem (SISINNO & TORRES, 2013).

A Resolução 357/2005 do Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA, alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água, diretrizes ambientais para o seu enquadramento e estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, preconiza no inciso 3º do artigo 8º, que a qualidade dos ambientes aquáticos poderá ser avaliada por indicadores biológicos, quando apropriado, utilizando-se organismos e/ou comunidades aquáticas (BRASIL, 2005).

Não foi encontrado na literatura pesquisada registro sobre ensaios utilizando biomarcadores bioquímicos associados a análises microbiológicas em ostras nos municípios da Ilha de São Luís - MA. A integração de metodologias cientificamente reconhecidas é altamente recomendada (BRASIL, 2005; FARIA et al., 2009). Através dessa associação de

métodos a região em estudo poderá obter informações mais completas e relevantes dos efeitos dos contaminantes sobre a saúde dos organismos e do ambiente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

A Ilha de São Luís localiza-se no litoral norte do Estado do Maranhão, na região denominada de golfo maranhense (IBGE, 2014). Abrange os Municípios de São Luís, Paço do Lumiar, São José de Ribamar e Raposa (Figura 1). Limita-se com o Oceano Atlântico, ao Norte; com o Estreito dos Mosquitos, ao Sul; com a Baía de São Marcos, a Oeste e Leste com a Baía de São José. Tem 1.362,264 km² de extensão territorial, com população estimada de 1.366.266 habitantes (IBGE, 2014).



Figura 1 - Localização dos pontos de coleta das ostras na Ilha de São Luís – MA, Brasil, 2014.

4.2 Identificação dos pontos de coleta de ostras

A pesquisa foi realizada no período de dezembro de 2013 a janeiro de 2015, sendo a primeira etapa das coletas, de fevereiro a junho (estação chuvosa) e a segunda etapa, de julho a outubro (estação de estiagem). Foram realizadas visitas (via transporte terrestre e via

embarcação a motor) nos municípios da Ilha de São Luís, para reconhecimento da área em estudo, localização das comunidades marisqueiras de ostras, assim como a identificação dos bancos naturais para extração dos moluscos bivalves.

Foram identificados e georreferenciados quatro pontos de extração, sendo dois no município de Raposa em locais denominados de Porto do Braga (S 02°25'215" e W 044°05'660") e Cais da Raposa (S 02°24'985" e W 044°06'243") e dois no município de Paço do Lumiar, Porto do Cumbique (S 02°27'531" e W 044°07'507") e Pau Deitado (S 02°31'818" e W 044°05'080").



Figura 2 - Áreas de depósitos naturais de ostras identificados para realização das coletas. A) Porto do Braga; B) Cais da Raposa (Município de Raposa-MA); C) Porto do Cumbique; D) Porto do Pau Deitado (Município de Paço do Lumiar - MA), 2014.

4.3 Obtenção das amostras

Após a identificação dos 4 pontos de extração das ostras foram coletadas, em cada local, 16 amostras de ostras e de água. Cada amostra de ostra foi composta por 12 unidades de organismos. Para a coleta da água foram utilizados frascos esterilizados de 250 mL.

Totalizando 64 amostras de ostras e 64 de água. Todas as amostras foram acondicionadas separadamente em caixas isotérmicas, sob refrigeração e transportadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, para imediata realização das análises microbiológicas.

4.4 Preparação das amostras

No laboratório os exemplares de ostras foram higienizados externamente com água corrente. Em seguida foram abertos com auxílio de facas previamente esterilizadas para a retirada do conteúdo (tecido mole e líquido intervalvar).

4.5 Análise de ostras utilizando biomarcadores

As amostras de ostras analisadas para a quantificação dos biomarcadores bioquímicos corresponderam aos meses de março e maio (chuvoso) e agosto e outubro (estiagem). De cada exemplar de ostra amostrado foi retirado 1g de tecido da glândula digestiva, acondicionado em microtubo tipo eppendorf e depositado em dry shipper, contendo nitrogênio líquido a -185°C para posterior análise. Posteriormente, as amostras de ostras foram descongeladas e homogeneizadas em tampão fosfato, em seguida submetidas à centrifugação refrigerada por 30 minutos. O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade enzimática da glutationa-s-transferase (GST) e da catalase (CAT).

Para atividade da GST, a amostra homogeneizada foi centrifugada novamente por 70 minutos, a quantificação da atividade enzimática, a partir do sobrenadante, foi realizada através de espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm a 25° C, por 2 minutos conforme Keen et al. (1976) e modificado por Camargo e Martinez (2006). Utilizou-se cubeta de vidro, com 10µl de glutationa reduzida (GSH) e 10µl de 1-chloro-2,4 dinitrobenzene (CDNB) como substrato, em 960µl de tampão fosfato de potássio (0,1M) pH 7,0 adicionado de 20µl da amostra.

Já a atividade da CAT foi avaliada a 240nm a 25°C, por 1 minuto, através da taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) de acordo com Beutler (1975) e modificado por Ventura et al. (2002). Utilizou-se cubeta de quartzo com 990µl de meio de reação, adicionado de 10µl de amostra.

4.6 Análises microbiológicas das amostras de ostras e água

4.6.1 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes totais e Coliformes termotolerantes em ostras

Para análise microbiológica foram pesadas 25g de cada amostra, adicionadas em 225 mL de água peptonada, obtendo-se a primeira diluição (10^{-1}). A partir desta, retirou-se uma alíquota de 1 mL que foi adicionada em tubos contendo 9 mL de água peptonada para obtenção da segunda diluição (10^{-2}) e, assim sucessivamente até a obtenção da diluição 10^{-3} .

Em seguida foram inoculadas três alíquotas de cada diluição em três séries de três tubos contendo Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) e tubo de Durhan invertido em seu interior, incubados em estufa bacteriológica a 35°C (24-48h). Posteriormente, foram considerados como positivos na prova presuntiva, aqueles tubos com caldo turvo e produção de gás. Para a confirmação dos Coliformes totais foi transferido uma alçada de cada tubo positivo, para tubos contendo caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB) e incubados em temperatura igual à citada anteriormente, considerando-se como positivo os tubos com caldo turvo e produção de gás. Destes foram inoculados uma alíquota em tubos contendo caldo EC (*Escherichia coli*) e incubados em banho-maria a temperatura de $45,5^{\circ}\text{C}$ por 24h. Posteriormente, os tubos de EC com turvação e com produção de gás foi considerado confirmativo para a presença de Coliformes a 45°C (Coliformes termotolerantes) e determinado o Número Mais Provável – NMP/g, conforme a tabela de Hoskis (BRASIL, 2001).

4.6.2 Pesquisa de *Escherichia coli* nas amostras de ostras

Para a pesquisa de *Escherichia coli* foram semeadas alíquotas de cada amostra do tubo positivo no caldo EC, em placas contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e incubadas em estufa bacteriológica a temperatura de 37°C por 24h. Após este período, foram selecionadas 3 colônias sugestivas (coloração verde metálico) e transferidas para tubos de TSA inclinado, que foram incubados em estufa de temperatura de 37°C por 24h. Em seguida, foram realizados esfregaços corados pelo método de Gram, para a verificação de sua morfologia. Após a constatação da presença de bacilos Gram-negativos, estes foram submetidos à confirmação bioquímica, onde foram realizados os testes: Produção de Indol (I),

Vermelho de Metila (MV), Voges-Proskauer (VP) e utilização do Citrato (C), segundo a técnica descrita por Vanderzant & Splittsoesser (1992).

4.6.3 Pesquisa de *Aeromonas* spp.

Foram pesadas 25 gramas da amostra e adicionadas em 225 mL do Caldo Trypticase Soja (TSB), adicionados de ampicilina (30 mg/L) e, incubadas a 28°C por 24 h. Após este período, foram semeadas alíquotas do crescimento bacteriano em placas contendo Ágar Vermelho de Fenol-amido-ampicilina (MAJEED et al., 1990; PALUMBO et al., 1991) e Ágar Dextrina-ampicilina, segundo Havelaar & Vonk (1988), adicionadas de ampicilina (10mg/L) e incubadas a 28°C por 24 horas.

Para isolamento das colônias e identificação presuntiva do gênero foram selecionadas até três colônias típicas, em cada um dos meios que foram utilizados e semeados em Ágar Trypticase Soja (TSA) inclinado e incubados a 28°C por 24 h. Após a incubação foi realizada a coloração pelo método de Gram e selecionadas as culturas que se apresentarem na forma de bastonetes retos e curtos, aos pares, isolados ou em cadeias curtas e Gram negativas. Estas foram repicadas em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) (SAAD et al. 1995) e incubadas a 28°C por 24 h, sendo consideradas positivas as culturas que apresentarem reação ácida na base e bisel. As culturas positivas foram submetidas à prova de oxidase e catalase.

O teste da oxidase foi realizado conforme as instruções do fabricante (NewProv). A prova de catalase consistiu na transferência da colônia com a alça de níquel-cromo previamente flambada, para uma lâmina de vidro, sobre a qual foi adicionada uma gota de água oxigenada. A reação positiva foi caracterizada pela observação do borbulhamento imediato, como resultado de liberação de oxigênio molecular.

As cepas positivas nesses dois testes foram consideradas como pertencentes ao gênero *Aeromonas* e submetidas às provas bioquímicas para a identificação das espécies (*Aeromonas schubertii*, *A. caviae*, *A. trota*, *A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. veronii* biovar *veronii*), segundo a chave de identificação Aerokey II (CARNARHAN et al., 1991) composta dos seguintes testes: hidrólise da esculina, produção de indol, produção de gás a partir de glicose, Voges Proskauer, produção de ácido a partir da arabinose e da sacarose e resistência à cefalotina (30µg).

4.6.4 Contagem de microrganismos heterotróficos mesófilos

Para a quantificação de bactérias aeróbias mesófilas foi utilizado o método do plaqueamento em profundidade, inoculando-se 1 mL de cada diluição em placas de Petri esterilizadas, em seguida adicionada de 15 mL de Ágar Padrão para Contagem (PCA), previamente fundido e resfriado. Após a homogeneização e solidificação do meio em temperatura ambiente, as placas foram invertidas e incubadas à temperatura de 35°C por 48 horas em aerobiose. Após o período de incubação, foram selecionadas as placas que apresentaram entre 25 e 250 colônias para a realização da contagem das mesmas. O valor obtido na contagem foi multiplicado pelo respectivo fator de diluição e calculado a média aritmética da amostra. O resultado encontrado foi expresso em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g).

4.6.5 Determinação do NMP de Coliformes totais e pesquisa de *Escherichia coli* nas amostras de água

Para a determinação de Coliformes totais e *E. coli* na água coletada dos locais de extração de ostra, 10 mL de cada amostra foi diluído em 90 mL de água estéril, perfazendo 100 mL, segundo a metodologia recomendada pela American Public Health Association - APHA (2005). A análise foi realizada por meio do método rápido Colilert®, segundo as instruções do fabricante, que utiliza o substrato enzimático composto pelos nutrientes indicadores, o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (ONPG) e o β-D glucuronídeo (MUG).

Para a interpretação do resultado foram consideradas Coliformes totais as células de cor amarela e *E. coli* as azuis fluorescente quando exposta à luz ultravioleta. O resultado em Número Mais Provável - (NMP) foi obtido utilizando-se tabela de probabilidade com limite de confiança de 95%.

4.7 Obtenção dos dados socioeconômicos e higienicossanitários

Foram entrevistados 19 marisqueiros utilizando-se questionário semiestruturado de cunho qualitativo, que versavam sobre questões socioeconômicas (nível de renda, local e condições de moradia, composição familiar, idade e escolaridade), percepção higienicossanitária e procedimentos relacionados na coleta, armazenamento, transporte e

conservação das ostras até a primeira comercialização. A abordagem foi realizada nas moradias, nos pontos de trabalho e/ou locais de comercialização de ostras.

Para a aplicação dos questionários e registros fotográficos foi solicitada a autorização dos entrevistados por meio da leitura do termo de consentimento prévio e assinatura do mesmo (Apêndice A).

4.8 Obtenção de parâmetros abióticos

A salinidade da água foi obtida *in situ* com auxílio de refratômetro manual (% BRix). Os índices pluviométricos para a Ilha de São Luís no período de realização das coletas foram fornecidos pelo Núcleo Geoambiental do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual do Maranhão - NUGEO.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Biomarcadores bioquímicos em ostras coletadas na Ilha de São Luís

Pelos dados da Figura 3 observa-se que as ostras oriundas da área do Porto do Cumbique, apresentaram maior atividade enzimática para a glutathione s-transferase nos dois períodos de coleta, seguido do Porto do Braga no período chuvoso. Já para a área do Porto do Pau Deitado, o valor foi quase nulo nesse mesmo período, o que pode indicar maior ocorrência de contaminação nesse local e, conseqüentemente, mais danos sobre os organismos aquáticos residentes. Tal fato pode estar relacionado com os impactos negativos provocados pela falta de saneamento básico na área e, principalmente, pela existência de um lixão a céu aberto próximo a um dos Igarapés da região. No período das chuvas, o nível de contaminação nos corpos hídricos pode se elevar, devido à lixiviação e carreamento dos contaminantes, tais como chumbo e esgoto, para esses locais.

Lemos, Ferreira Neto & Dias (2010) constataram variação na qualidade bacteriológica da água na Lagoa do Apodi – RN, principalmente logo após o período das chuvas. Similarmente, Brito et al. (2012) registraram um aumento nas concentrações de herbicidas na água do rio Poxim-Sergipe, em período chuvoso, o que foi vinculado ao escoamento superficial.

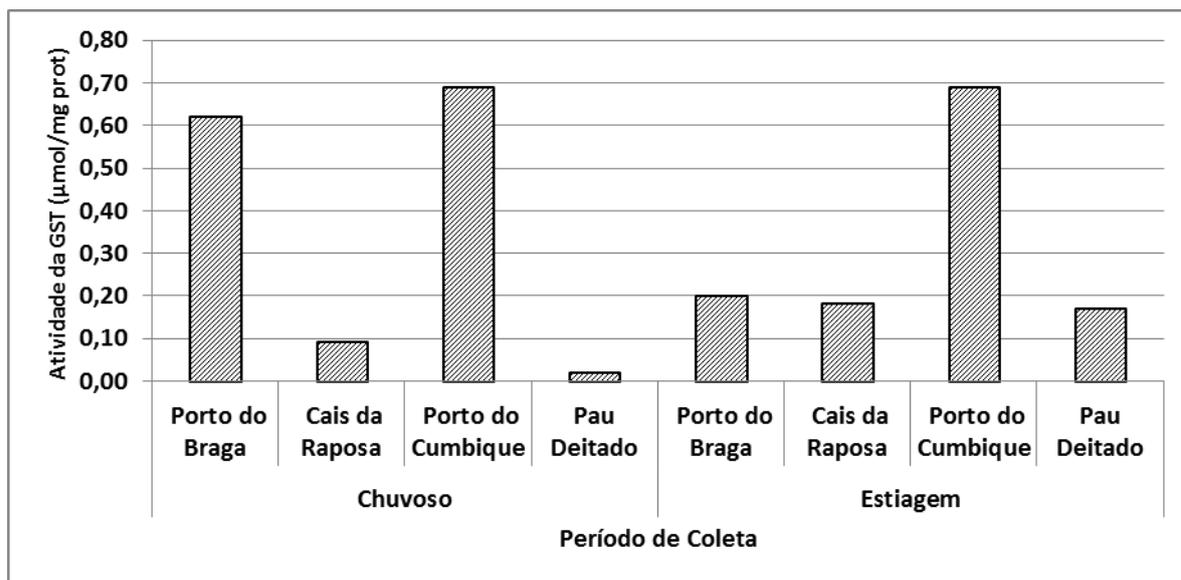


Figura 3 - Atividade enzimática da glutatona s-transferase (GST) em ostras do gênero *Crassostrea* no período chuvoso e de estiagem, Ilha de São Luís-MA, 2014.

Para a atividade da catalase os valores foram mais homogêneos, sendo os maiores níveis observados no Porto do Cumbique, nos dois períodos (chuvoso e estiagem), Cais da Raposa no período chuvoso, seguido de Porto do Braga no período de estiagem (Figura 4).

As enzimas glutatona s-transferase e a catalase são importantes para equilíbrio do organismo por atuarem no sistema de defesa antioxidante, o que permite inferir que os resultados mais elevados indicados nas Figuras 3 e 4 para essas enzimas demonstram que o sistema detoxificante dos organismos analisados está reagindo em resposta à presença de algum agente estressor no ambiente. No entanto, tais agentes, dependendo da sua intensidade, frequência e periodicidade podem provocar redução na atividade de defesa enzimática do organismo, ou mesmo esgotá-la, como foi observado em Porto do Pau Deitado.

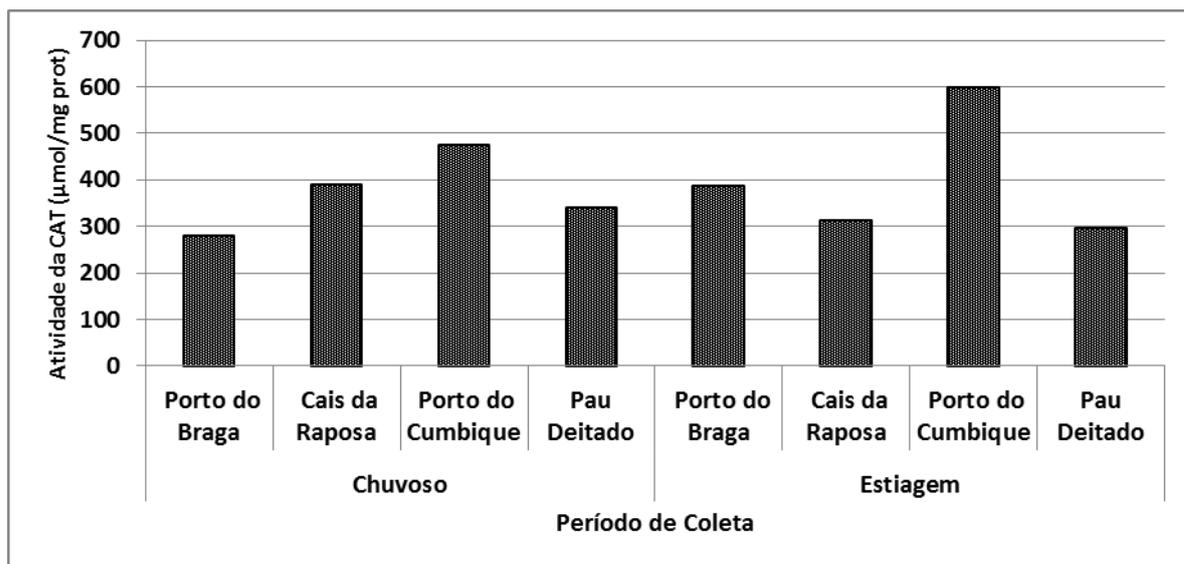


Figura 4 - Atividade enzimática da catalase (CAT) em ostras do gênero *Crassostrea* no período chuvoso e de estiagem, Ilha de São Luís-MA, 2014.

Estudos evidenciam que o processo de estresse oxidativo e as atividades antioxidantes em moluscos bivalves podem ser influenciados pela presença de poluentes químicos e biológicos. Além destes fatores, parâmetros ambientais tais como temperatura da água, variação da salinidade, pH, oscilação de maré, quantidade de chuvas entre outros, também o fazem (NIYOGI et al., 2001; ALMEIDA et al., 2007).

Na Figura 3 observa-se que no período chuvoso ocorreu maior atividade da glutathione s-transferase, coincidindo com o período cujos percentuais foram mais representativos para Coliformes totais, Coliformes termotolerantes (no Porto do Pau Deitado e Porto do Cumbique) (Tabela 4) e *Aeromonas* spp. (no Porto do Cumbique) encontrados nesta pesquisa (Figura5). Estes microrganismos podem estar relacionados com a maior ocorrência de estresse oxidativo nos moluscos bivalves analisados e provenientes dessas áreas de extração que estão expostas a descarga de diversos tipos de agentes patogênicos.

Na Figura 4 observa-se que a maior atividade da catalase ocorreu no período de estiagem, onde foram registrados os dados microbiológicos mais expressivos para a presença de bactérias mesófilas (no Porto do Braga) e *Escherichia coli* (no Porto do Pau Deitado). A presença dessas bactérias evidencia a ocorrência de contaminação ambiental de origem fecal que de alguma forma pode está afetando a saúde das ostras nesses locais.

Oost, Beyer & Vermeulen (2003) mencionam que infecções bacterianas podem influenciar na atividade das enzimas de biotransformação em organismos aquáticos. Tal como em estudo realizado em carpas (*Cyprinus carpio*) cuja infecção causada por *Listeria*

monocytogenes diminuiu significativamente a indução de várias enzimas dentre elas a glutatona s-transferase.

Zanette et al., (2008) em estudo realizado com tecido de *C. rhizophorae*, em Santa Catarina encontrou correlação positiva entre os níveis de Coliformes termotolerantes e a maior atividade da catalase, sugerindo uma possível associação entre esta enzima e produtos químicos descarregados no esgoto doméstico não tratado.

5.2 Aspectos microbiológicos de ostras e de amostras de água dos locais de coleta na Ilha de São Luís

A Tabela 1 mostra que todas as amostras de água das áreas de coleta de ostras apresentaram contaminação por Coliformes totais (Ct) e *E. coli*.

No primeiro período de coleta (chuvoso) as maiores médias estimadas de NMP para Ct nas amostras de água ocorreram na área do Porto do Pau Deitado e Porto do Cumbique e no segundo período (estiagem) ocorreu o inverso, maiores médias no Porto do Cumbique seguido da área do Porto do Pau Deitado. Para *E. coli* no primeiro período as maiores contagens ocorreram no Porto do Cumbique e Cais da Raposa, enquanto que no segundo período de coleta ocorreram no Porto do Cumbique e Porto do Pau Deitado.

Tabela 1- Determinação de Coliformes totais (Ct) e pesquisa de *Escherichia coli* em água de quatro pontos de coleta de ostras do gênero *Crassostrea* nos períodos chuvoso e de estiagem na Ilha de São Luís – MA, 2014.

LOCAL DE COLETA	ÁGUA (NMP/mL)					
	Chuvoso			Estiagem		
	*N	Ct	<i>E. coli</i>	*N	Ct	<i>E. coli</i>
Porto do Braga	9	9 (100%)	9 (100%)	7	7 (100%)	7 (100%)
Média/**DP		$1 \times 10^3 \pm 7,5 \times 10^2$	$1,5 \times 10 \pm 7,3$		$1,4 \times 10^3 \pm 7,4 \times 10^2$	$8,65 \pm 5,6$
Cais da Raposa	9	9 (100%)	9 (100%)	7	7 (100%)	7 (100%)
Média/**DP		$1,1 \times 10^3 \pm 7,4 \times 10^2$	$2,1 \times 10 \pm 1,2 \times 10$		$1,1 \times 10^3 \pm 6,1 \times 10^2$	$9,22 \pm 1 \times 10$
Porto do Cumbique	9	9 (100%)	9 (100%)	7	7 (100%)	7 (100%)
Média/**DP		$1,6 \times 10^3 \pm 9,1 \times 10^2$	$2,3 \times 10 \pm 9,5$		$1,9 \times 10^3 \pm 6,6 \times 10^2$	$1,3 \times 10 \pm 9,4$
Porto Pau Deitado	9	9 (100%)	9 (100%)	7	7 (100%)	7 (100%)
Média**/DP		$1,8 \times 10^3 \pm 8,4 \times 10^2$	$2 \times 10 \pm 9,5$		$1,8 \times 10^3 \pm 7,3 \times 10^2$	$9,8 \pm 3,5$
TOTAL	36			28		

*N= número de amostras analisadas. **DP= Desvio Padrão.

Com base nos resultados encontrados, infere-se que as águas das áreas analisadas apresentaram contaminação de origem antrópica. Embora a Resolução CONAMA nº357/2005, alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011, não indicar um limite para os Coliformes totais em águas cujas áreas são locais de extração de moluscos destinados à alimentação, considera-se que esse grupo bacteriano indica e auxilia na verificação da possível presença de microrganismos causadores de danos à saúde pública. Tal fato é confirmado, visto que a bactéria *E. coli*, que é um dos principais representantes dos Coliformes termotolerantes, foi constatada nas amostras de água analisadas.

Christo et al. (2008) sugerem uma condição de impropriedade o consumo de organismos crus, extraídos de áreas com presença de Coliformes totais e *E. coli*, sem prévia depuração.

Fatores como a ocupação desordenada do solo, os loteamentos irregulares, avanço imobiliário sobre as regiões de mangues, agravado pela falta de saneamento básico constituem fonte permanente de poluição dos sistemas aquáticos. Dependendo da época do ano, esses locais estarão mais expostos à maior ou menor contaminação (DOI; BARBIERI & MARQUES, 2014).

Para o cultivo de moluscos bivalves destinados à alimentação humana, a Resolução CONAMA nº 357/2005, alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011, determina que a média geométrica da densidade de coliformes termotolerantes em águas salobras e salinas, de um mínimo de 15 amostras coletadas no mesmo local, não deverá exceder 43 por 100 mililitros, e o percentil 90% não deverá ultrapassar 88 coliformes termotolerantes por 100 mililitros. Esses índices deverão ser mantidos em monitoramento anual em um número mínimo de 5 amostras. A *E. coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro Coliformes termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

Considerando-se o total de amostras de água coletadas em cada ponto de extração, a densidade de *E. coli* variou entre 1 a 28,3 no Porto do Braga; 1 a 46,3 no Cais da Raposa; 1 a 51,2 no Porto do Cumbique; e 6 a 44,1 no Porto do Pau Deitado. A partir desses resultados verificou-se que as amostras de água apresentaram-se dentro dos limites preconizados tanto para águas salobras, como para águas salinas Classe 1, destinadas à aquicultura e à atividade de pesca, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Média geométrica e percentil 90% das contagens de *E. coli* em amostras de água de quatro pontos de coleta de ostras do gênero *Crassostrea* na Ilha de São Luís – MA, fevereiro a outubro/2014.

LOCAL DE COLETA	*MÉDIA GEOMÉTRICA ***NPM/mL	**PERCENTIL 90 % ***NPM/mL
Porto do Braga	9,73	27,74
Cais da Raposa	11,05	36,57
Porto do Cumbique	14,15	41,33
Porto do Pau Deitado	13,66	28,35

Resolução CONAMA nº357/2005/410/2009/430/2011): *≤ 43/100 mililitros; e ** ≤ 88/100 mililitros.

***NPM= Número Mais Provável.

De acordo com a Resolução CONAMA nº 357/2005, alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011, as águas salobras apresentam salinidade superior a 0,5 e inferior a 30, enquanto águas salinas possui valor igual ou superior a 30. Dessa forma, as águas provenientes do Porto do Pau Deitado podem ser classificadas como salobras, enquanto as do Porto do Braga, Cais da Raposa e Porto do Cumbique podem ser classificadas como salinas, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores de salinidade em águas coletadas nos quatro pontos de extração de ostras, Ilha de São Luís, 2014.

Locais	Porto do Braga	Cais da Raposa	Porto do Cumbique	Porto do Pau Deitado
	35,0	35,0	30,0	26,0
	33,0	33,0	31,0	23,0
	34,0	36,0	33,5	32,0
	34,0	34,0	34,0	28,0
	33,0	36,0	35,0	28,0
Média e Desvio Padrão	33,8±0,75	34,8±1,17	32,7±1,90	27,4±2,90

Os resultados obtidos mostraram maior contaminação na água (Tabela 1) que nos tecidos de ostras (Tabela 4). Situação compatível com o encontrado por Vieira et al. (2008) ao analisar a qualidade microbiológica de ostras e de água de cultivo no Estuário do Rio Pacoti – Ceará.

Tabela 4 – Determinação de Número Mais Provável (NMP) de Coliformes totais (Ct), termotolerantes (CT) e pesquisa de *Escherichia coli* em amostras de ostras do gênero *Crassostrea* coletadas nos períodos chuvoso e de estiagem em quatro pontos de extração na Ilha de São Luís – MA, 2014.

LOCAL DE COLETA	OSTRA (NMP/g)							
	Chuvoso				Estiagem			
	*N	Ct	CT	<i>E. coli</i>	*N	Ct	CT	<i>E. coli</i>
Porto do Braga	9	6 (16,66%)	4 (11,11%)	0	7	4 (14,20%)	2 (7,14%)	1 (3,57%)
Média/**DP		0,8± 0,6	0,5± 0,2			6 x 10 ² ± 1 x 10 ³	0,4± 0	
Cais da Raposa	9	5 (13,80%)	3 (8,33%)	0	7	4 (14,20%)	3 (10,71%)	1 (3,57%)
Média/**DP		2,6± 2,5	0,7± 0,5			2,7 x 10 ² ± 4,7 x 10 ²	0,5± 0,2	
Porto do Cumbique	9	7 (19,44%)	4 (11,11%)	1 (2,77%)	7	4 (14,20%)	2 (7,14%)	1 (3,57%)
Média/**DP		3,5 x 10± 8,3 x 10	0,8± 0,4			1± 0,29	0,7± 0,3	
Porto Pau Deitado	9	7 (19,44%)	6 (16,66%)	2 (5,55%)	7	4 (14,20%)	4 (14,28%)	3 (10,71%)
Média/**DP		6,8 x 10± 1,5 x 10 ²	1,3± 1,3			4,2 x 10± 6,2 x 10	1,8± 1,4	
TOTAL	36				28			

*N= número de amostras analisadas. **DP= Desvio Padrão.

Para Sande et al. (2010) a contagem de microrganismos em tecidos de bivalves deveria ser maior do que na água, devido a sua anatomia contribuir para acumulação de partículas alimentares, seja por sucção direta, seja pelas correntes d'água provocadas pelo processo respiratório branquial do animal.

Contudo, os fatores ambientais podem ter relação com a capacidade maior ou menor de armazenar poluentes ou mesmo de selecionar os microrganismos e substâncias presentes na água. Ramos et al. (2010) informa que o acúmulo de microrganismos no corpo do molusco filtrador difere de um organismo para outro, depende da atividade geral do molusco, além das condições meteorológicas.

Doi, Barbieri & Marques (2014) verificaram que a pluviosidade, salinidade e as amplitudes de maré influenciaram na concentração bacteriana ao analisar as águas nos locais de extrativismo de ostras no Estuário de Cananeia - SP.

As médias estimadas dos níveis pluviométricos verificados no primeiro (8,136mm±13,52) e segundo (0,33mm±1,42) período de coleta podem justificar o maior percentual de amostras de ostras contaminadas no primeiro período (chuvoso), conforme os resultados demonstrados na Tabela 4, onde 69% e 57% das ostras analisadas apresentaram Coliformes totais e 47% e 39% Coliformes termotolerantes (período chuvoso e estiagem, respectivamente).

Os Coliformes caracterizam as condições higienicossanitárias e indicam a eventual presença de enteropatógenos nos alimentos. Conforme observado durante as coletas das ostras, os locais de extração encontram-se próximos ao meio urbano, o que favorece a ocorrência de vários fatores que contribuem para a presença destes microrganismos, como o lançamento de esgotos próximos aos locais de captura. Soma-se a isto a manipulação inadequada, falhas nas etapas de transporte, acondicionamento, beneficiamento e comercialização desses organismos.

O percentual para *E. coli* de 8,32% e 21,42% em tecidos de ostras indica uma elevação no segundo período (Tabela 4). A área do Porto do Pau Deitado influenciou com o maior número de isolados dessa bactéria nesse período, onde foi também verificado o menor nível de salinidade (Tabela 3).

Este resultado indica que nesse local de extração de ostras houve contaminação fecal. De acordo com Vieira et al. (2008) pode haver a presença de outros microrganismos patogênicos e acrescentam que a microbiota desses animais está diretamente relacionada ao ambiente do qual são provenientes.

A *Escherichia coli* apresenta-se em grandes densidades na matéria fecal, pois tem como habitat natural o trato intestinal do homem e de outros animais de sangue quente. No entanto, podem ser introduzidas via ausência de higiene geral no manuseio do alimento e armazenamento inadequado (CARDOSO et al., 2001; DOI; BARBIERI & MARQUES, 2014).

Escherichia coli é um dos patógenos de maior importância quando se deseja detectar contaminação por esgotos. Todavia, há semelhança com as demais bactérias, pois ela necessita de condições favoráveis para se multiplicar. A água do mar, devido a grande concentração de sal, pode funcionar como fator limitante para a sua multiplicação (VIEIRA, 2001).

A Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 12/2001 estabelece os padrões microbiológicos para alimentos, porém não o faz para moluscos bivalves consumidos crus, que é a forma comum de consumo das ostras na Ilha de São Luís-MA. Essa ausência de regulamentação da Lei dificulta a avaliação microbiológica desse alimento. O que constitui uma insegurança para a população consumidora desse molusco.

Diversos estudos destacam que as enfermidades veiculadas por alimentos são frequentes no Brasil, e diversos casos estão associados ao consumo de origem marinha (POTASMAN; PAZ & ODEH, 2002; WELKER et al. 2009; SANTOS & VIEIRA, 2013).

Quanto à pesquisa de bactérias do gênero *Aeromonas*, do total de 64 amostras de ostras analisadas, nos dois períodos de coleta (chuvoso e estiagem), 47% (30) estavam contaminadas por bactérias do gênero *Aeromonas*, sendo todas confirmadas para a espécie *A. hydrophila* (Figura 5). O valor encontrado está diretamente relacionado ao fato de que as ostras podem concentrar as partículas e microrganismos do fluxo de água filtrado, principalmente os que têm esse ambiente como hábitat natural. O que condiz com os diversos estudos já realizados, no qual destacam que a biota bacteriana de um organismo bioindicador de ecossistemas aquáticos costuma refletir as características do local em que habitam. Huss (1997) e Sá (2004) afirmam que esta bactéria pode ser encontrada em ambientes de água doce, podendo ser isolada também de água salgada e estuarina, sendo de modo geral os ambientes aquáticos as principais fontes de *A. hydrophila*.

Silva et al. (2014) realizaram estudo nos municípios de Raposa - MA e Humberto de Campos - MA, onde isolaram e caracterizaram, por métodos bioquímicos e moleculares, bactérias do gênero *Aeromonas* (*A. hydrophila* e *A. caviae*) em 100% (15) das amostras de água de cultivo e 65,51% (38) das amostras de ostras, os quais foram justificados devido a contaminação das águas costeiras e ausência de tratamento dos bivalves antes da comercialização.

A. hydrophila está entre as cinco espécies de relevância clínica por serem agentes patogênicos tanto para peixes como para os seres humanos, devido à sua capacidade de produzir exotoxinas (PEIXOTO et al., 2012). Em seres humanos podem causar gastroenterites transmitidas pelo contato e consumo de alimento e água contaminados (ABDULLAH et al., 2003).

Considerando os quatro pontos de origem das ostras em dois períodos diferentes de coleta, o Porto do Cumbique foi o que apresentou o maior percentual de contaminação por *A. hydrophila*, no primeiro período e o Porto do Pau Deitado, no segundo (Figura 5). Apesar destes resultados representativos, as quatro áreas analisadas apresentam características semelhantes no que se refere à movimentação de embarcações marítimas e a inserção no contexto espacial urbanizado, sendo o Porto do Pau Deitado a área que tem maior proximidade. A área do Porto do Cumbique está localizada em posição de transição entre os Municípios de Raposa e Paço do Lumiar, além disso, nessa localidade deságuam vários igarapés da região.

Tais características tornam os dois pontos com maior representatividade, em alvo dos produtos lixiviados a partir do seu entorno, contribuindo assim, para o aumento da microbiota ambiental.

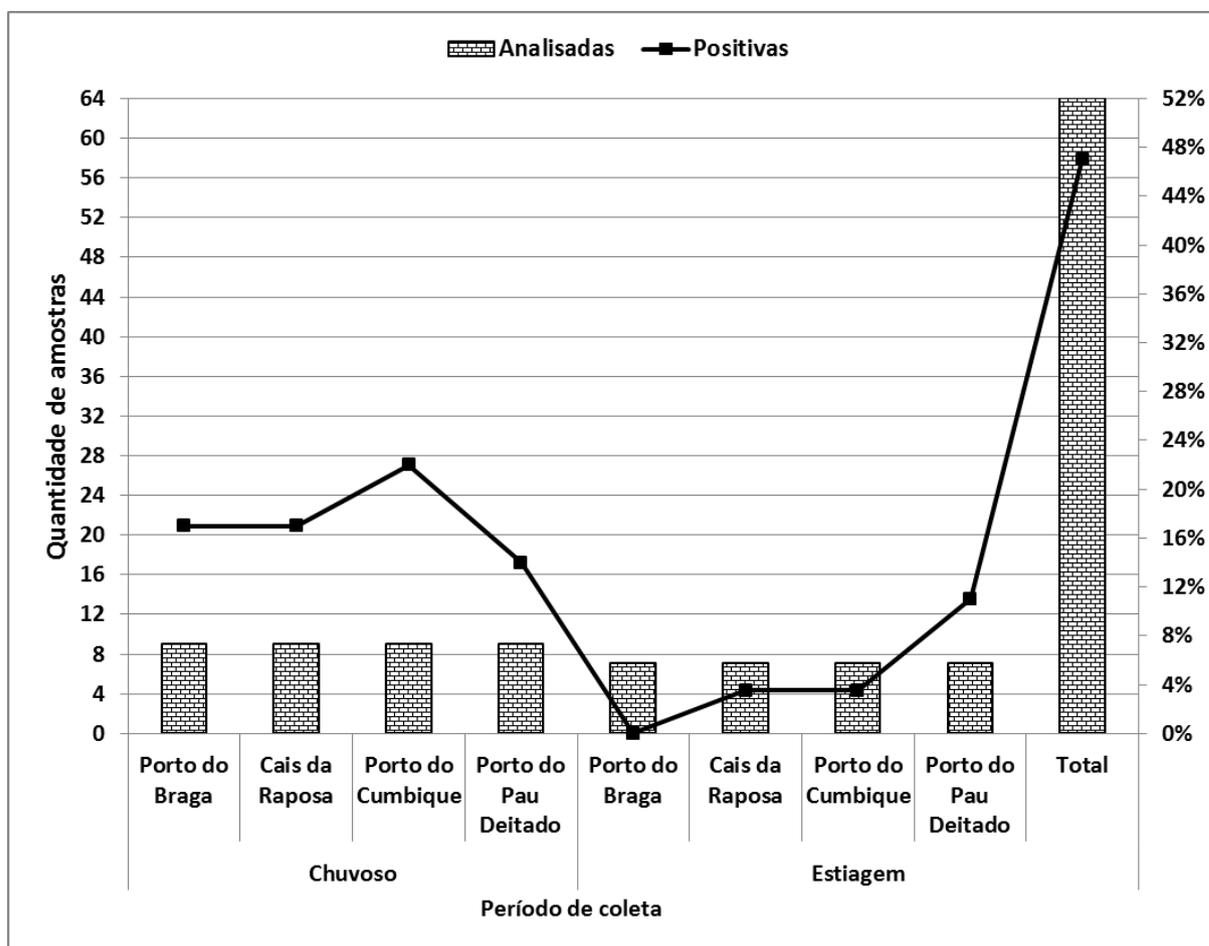


Figura 5 - Percentual de amostras de ostras do gênero *Crassostrea* analisadas e contaminadas por *A. hydrophila*, coletadas nos períodos chuvoso e de estiagem em quatro pontos de extração na Ilha de São Luís – MA, 2014.

Araújo et al. (1989) encontrou significativa correlação entre o conteúdo de matéria orgânica e o número total de *Aeromonas* spp. em ambiente aquático poluído. Ghenghesh et al. (2008) afirmam que *Aeromonas* spp. ocorrem em esgoto bruto, esgoto tratado e lodos ativados. No entanto, não ocorrem em água com uma elevada salinidade. No presente estudo verificou-se que as duas áreas com maior expressividade de contaminação por *A. hydrophila*, apresentaram os menores níveis de salinidade (Tabela3).

Observou-se que no primeiro período de coleta houve o maior número de amostras contaminadas, pelo menos quatro vezes mais em relação ao segundo, o que pode estar relacionado com a estação do ano com maior índice de precipitação pluviométrica. O que

favorece a ocorrência de *A. hydrophila* devido ao aumento de nutrientes nos corpos hídricos da região.

Na Tabela 4 verifica-se os resultados obtidos pela contagem de bactérias heterotróficas mesófilas, onde os valores médios estimados indicam, respectivamente primeiro e segundo período, as maiores contagens na área do Porto do Cumbique e Porto do Braga.

Tabela 5 - Contagem de bactérias heterotróficas mesófilas em ostras do gênero *Crassostrea* coletadas nos períodos chuvoso e de estiagem em quatro pontos de extração na Ilha de São Luís – MA, 2014.

ORIGEM	Chuvoso			Estiagem		
	*N	**P	MÉDIA ***UFC/g	N	P	MÉDIA ***UFC/g
Porto do Braga	9	5,5% (2)	$8 \times 10^2 \pm 6 \times 10^2$	7	14,3% (4)	$2,8 \times 10^4 \pm 4,7 \times 10^4$
Cais da Raposa	9	13,9% (5)	$2 \times 10^3 \pm 2,4 \times 10^3$	7	14,3% (4)	$5,4 \times 10^3 \pm 6,7 \times 10^3$
Porto do Cumbique	9	13,9% (5)	$2,2 \times 10^3 \pm 2 \times 10^3$	7	17,8% (5)	$1,2 \times 10^3 \pm 9,7 \times 10^2$
Porto Pau Deitado	9	13,9% (5)	$2 \times 10^3 \pm 1,4 \times 10^3$	7	14,3% (4)	$1,8 \times 10^3 \pm 1,6 \times 10^3$
	36	47,2% (17)	$1,8 \times 10^3 \pm 5,3 \times 10^2$	28	60,7% (17)	$9,2 \times 10^3 \pm 1,1 \times 10^4$

*N= número de amostras analisadas; **P= presença; ***UFC= Unidade Formadora de Colônia.

Embora não exista um parâmetro microbiológico estipulado pela RDC n°12/2001 para os bivalves ingeridos crus, como já foi citado, a presença de mesófilos nas ostras analisadas é considerada preocupante, pois neste grupo está a maioria dos microrganismos patogênicos. Ressalta-se que as bactérias mesofílicas são indicadoras gerais de contaminação em um alimento. Conseqüentemente, a qualidade de um produto alimentício está relacionada à menor contagem desses indicadores.

Segundo Franco & Landgraf (2003), a contagem de bactérias mesófilas é importante porque fornece uma estimativa da contaminação microbiana total e altas contagens usualmente estão relacionadas à baixa qualidade dos produtos, pois a maioria dos patógenos de veiculação alimentar são mesófilos.

A qualidade microbiológica dos moluscos bivalves pode ser influenciada pela condição sanitária da água de onde são coletados, assim como pelas condições higiênicas de manipulação e conservação (NASCIMENTO et al., 2011).

Melo et al. (2010) verificaram que os manipuladores são a principal via de contaminação dos alimentos, e que fatores como o nível de conhecimento, capacitação, salário

e o percentual de adequação das condições higienicosanitárias mostraram correlação positiva entre si. O que demonstra que fatores sociais e econômicos são importantes e que podem influenciar sobre a qualidade final do produto.

5.3 Aspectos socioeconômicos dos marisqueiros de ostras

Os 19 marisqueiros de ostras entrevistados tinham em média 33 anos, com variação entre 17 e 64 anos, sendo a faixa etária com maior representatividade entre 21 e 30 anos, seguida de 31 a 40 anos (Figura 6). A maioria é casado ou união estável com 2 a 3 filhos. Observa-se predominância de adultos do sexo masculino no exercício de uma atividade do setor primário da economia local. Contrariamente, Monteles et al. (2009) caracterizou a predominância (96%) de mulheres atuando na mariscagem de sarnambi (*Anomalocardia brasiliiana*) e tarioba (*Iphigenia brasiliensis*) no Município de Raposa.

Em relação ao nível de escolaridade, a maior parte dos marisqueiros tem ensino fundamental incompleto, o que foi justificado devido à necessidade de trabalhar para sustentar a família, além da falta de escolas onde moravam. Para Alves & Nishida (2003), a necessidade de contribuir para a melhoria da renda e a falta de estímulo para levar adiante os estudos, podem ser apontados como principais fatores para o abandono dos bancos escolares e, conseqüentemente para o baixo nível de escolaridade desses trabalhadores. Santos, Carvalho-Neta e Almeida (2003) verificaram um elevado índice de analfabetismo em estudo realizado em três comunidades pesqueiras na Ilha de São Luís (São José de Ribamar, Timbuba e Quebra – Pote) em decorrência dos pescadores que quando jovens não disponibilizaram de tempo para os estudos e as instituições de ensino possuir calendário incompatível com as atividades de pesca, com isso desistiam ou não efetivavam a matrícula.

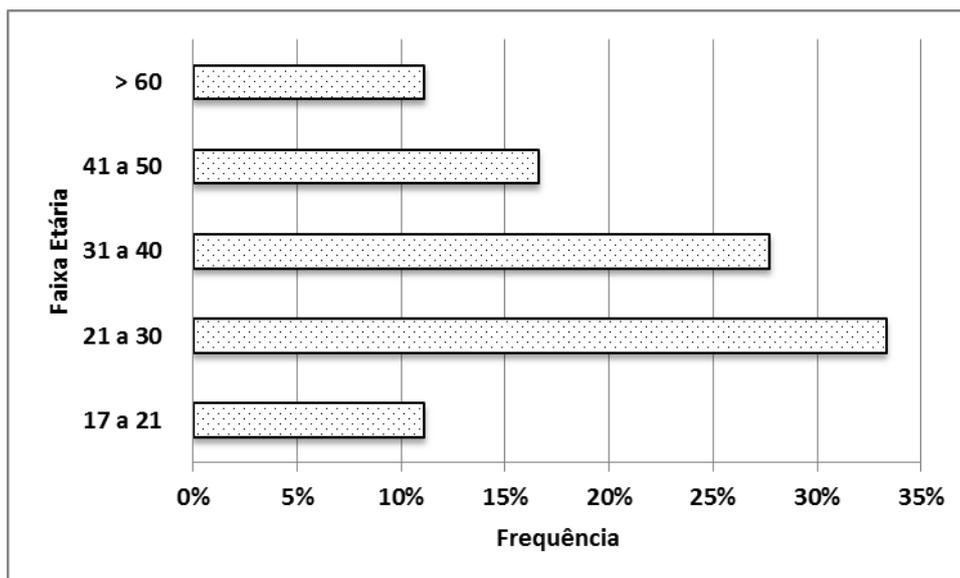


Figura 6 - Faixa etária dos marisqueiros de ostras entrevistados, Ilha de São Luís - MA, 2014.

Quanto à origem, a maioria é proveniente dos municípios maranhenses de Urbano Santos, Cândido Mendes, Barreirinhas, Cururupu, Pinheiro e Primeira Cruz, enquanto o segundo maior percentual corresponde aos marisqueiros oriundos principalmente dos Municípios de Raposa e Paço do Lumiar (Ilha de São Luís - MA), o restante é originário de outros Estados brasileiros (Alagoas, Ceará e Pará) (Figura 7). A maioria (84%) reside em casa própria de alvenaria, com luz elétrica e água encanada, (52,6%) possui banheiro dentro de casa, (84,2%) não possui instalação de esgoto, mas é provida de fossa seca ou séptica (68,4%).

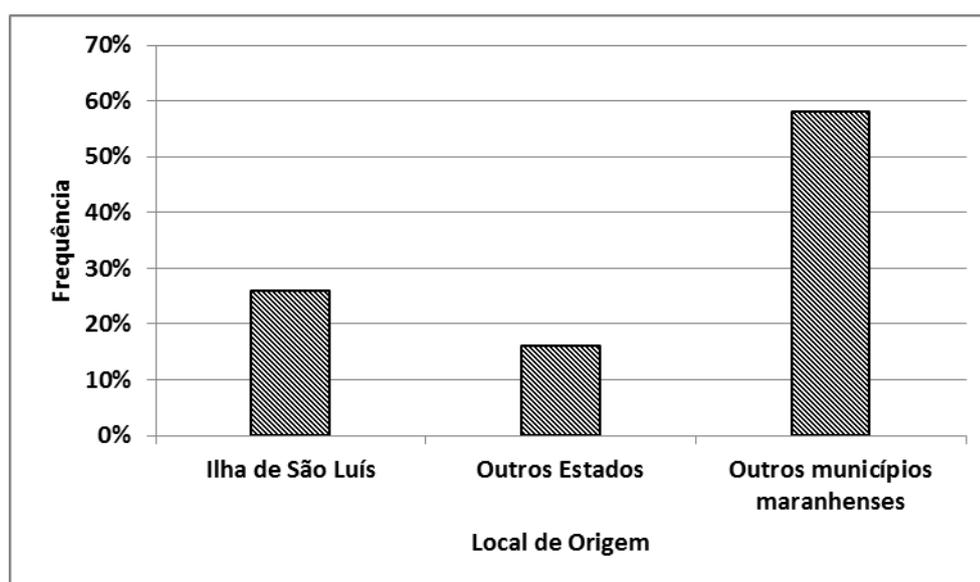


Figura 7 - Origem dos marisqueiros de ostra, Ilha de São Luís - MA, 2014.

Quanto à organização da atividade de mariscagem, a maior parte (84,2%) afirmou não ser cadastrado em nenhum tipo de associação, cooperativa ou colônia de pescador. Embora, já estivessem exercendo a atividade (ostreiro ou catador de ostra), em média há 9 anos, considerando-se que houve uma variação entre um e quarenta anos entre o mais recente na atividade e o mais antigo.

A minoria é cadastrada de forma generalizada como pescador, independente do produto da pesca, pois não existe um cadastro específico para categoria de marisqueiro ou ostreiro. O termo mariscagem é aplicado de forma abrangente e designa a atividade de extração ou catação de moluscos e crustáceos.

Maneschy (1993) explica que a razão para a desmobilização da categoria traduz certamente o fato de que os trabalhadores em questão incorporam a imagem desvalorizada e estereotipada de seu trabalho que predomina na sociedade, e que inibe a tomada de consciência de sua importância enquanto grupo profissional.

Observou-se que 63% dos indivíduos amostrados têm como principal atividade a coleta e venda de ostras, obtendo renda de um salário mínimo. Porém trabalham com outros recursos pesqueiros (peixe, sarnambi, camarão, sururu, siri, caranguejo e turu), conforme a disponibilidade no ambiente, valor de mercado e necessidade de incrementar a renda. Além de secundariamente prestarem serviços como pedreiros.

Alves & Nishida (2003) observaram que a comunidade de caranguejeiros situada no estuário do rio Mamanguape, no Estado da Paraíba, apresentou renda inferior a um salário mínimo, sendo a maioria (93%) da produção destinada para atravessadores. Monteles et al. (2009) verificaram que a mariscagem é a principal atividade e fonte de renda para 58% dos entrevistados, no Município de Raposa, na Ilha de São Luís enquanto que para os demais consiste apenas em um ganho adicional a renda de suas famílias, com isso buscavam outras alternativas financeiras (produção de artesanato com as conchas dos organismos capturados e fabricação de rendas e roupas).

O comércio de ostras tem como principais compradores (80%), os banhistas e turistas, donos de bares nas praias de São Luís aos fins de semana e principalmente na temporada de férias, e em menor frequência, atravessadores e para o próprio consumo. Tal resultado assemelha-se com a forma de comercialização dos mariscos na Raposa, observada por Monteles et al. (2009) em que 48% dos casos são destinados aos consumidores locais e de outras regiões, 28% para atender restaurantes especializados nessa iguaria, 16% serve como fonte de alimento para o próprio consumo e 8% para atravessadores.

5.3.1 Procedimentos desde a captura até a comercialização

O processo de extração é feito em bancos naturais, a maioria dos marisqueiros descreveu que verificam se as ostras estão fechadas, o tamanho e a coloração da concha. Utilizam instrumentos e utensílios como facão, faca, balde e saco de ráfia, para proteção usam sapatos, camisa de manga comprida, luva e óleo de motor, como repelente. Fazem a raspagem da raiz do mangue para retirar as ostras incrustadas ou as retira uma de cada vez (Apêndice B). Alguns afirmaram que cortam ou batem a raiz para fazer a sua retirada, em seguida acondicionam (Apêndice C).

A quantidade de ostras varia entre 35 a 40 dúzias a cada coleta. Alguns retiram o excesso de lama das ostras com água do mar e transportam para casa, onde são feitos os procedimentos de limpeza e conservação do produto, que consiste em diversos enxagues e acondicionamento na parte baixa da geladeira até o momento da venda do molusco.

Ressalta-se que tais procedimentos são realizados de forma rudimentar e em condições precárias de higiene e de infraestrutura, expondo o alimento a contaminação ambiental, seja por microrganismos patogênicos ou deteriorantes.

Os pescados de modo geral exigem diversos cuidados tanto em relação ao manuseio, como durante o processo de captura e estocagem em caixas térmicas (VIEIRA, 2004). Procedimentos de manipulação em contato direto com o alimento ou com auxílio de equipamento realizado de forma precária e mesmo em condições higienicossanitárias deficientes, interagem de forma sinérgica influenciando negativamente a qualidade do produto.

Feldhusen (2000) esclarece que em se tratando de alimentos procedentes da aquicultura, os fatores relacionados à segurança alimentar são diversos, localização geográfica dos cultivos, diferentes habitats, o método de produção, as práticas de manejo, as condições ambientais e procedimentos após a captura dos organismos.

Os tecidos moles das ostras apesar de estarem protegidos pela concha podem ser contaminados durante as etapas da cadeia produtiva. Basti et al. (2006) acrescentam que alguns microrganismos fazem parte da microbiota natural dos pescados, mas se forem ingeridos pelo homem, podem veicular doenças.

Para o processo de comercialização, as ostras são armazenadas em caixa de isopor contendo gelo (Apêndice D). O gelo utilizado em 37% dos casos é comprado no comércio e/ou produzido em casa, 31,5% utilizam somente o gelo comprado e 5,2% usam somente o

gelo caseiro. O gelo, apesar de não ser um meio de cultivo para bactérias, por falta de nutrientes necessários ao seu desenvolvimento, pode funcionar como um carreador desses microrganismos ao alimento em questão (VIEIRA, 2004).

Do total de 19 entrevistados, 63,15% afirmaram que levam em torno de 2 a 3 dias para comercializar as ostras. Com relação ao local da venda 63,15% ocorre somente na Praia do Calhau (Av. Litorânea), 15,7% vendem nas Praias do Aracagy, Olho d'Água e Praia do Meio.

Sobre os cuidados higiênicos necessários para a comercialização das ostras os resultados demonstraram que os marisqueiros adotam principalmente a lavagem das mãos (Figura 8). Apesar de demonstrarem ter ciência de algumas práticas corretas de manipulação, muitos cuidados mencionados por esses trabalhadores não foram observados durante o exercício da sua atividade comercial.

Observa-se que existe a necessidade de orientação sobre as boas práticas de manipulação, quanto aos cuidados com a higiene pessoal e para a manutenção da qualidade do alimento por eles capturados e comercializados.

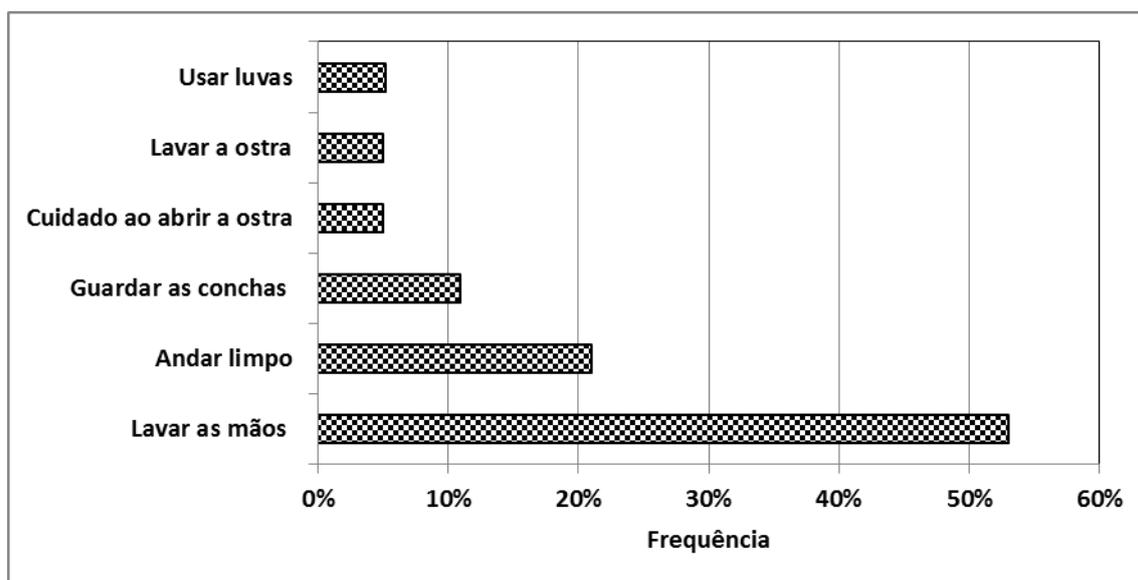


Figura 8 - Percentual dos principais cuidados higiênicos informados pelos marisqueiros para comercializar as ostras, Ilha de São Luís, 2014.

6 CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

- a alteração da atividade enzimática da glutathione s-transferase nas ostras analisadas é devido aos efeitos adversos dos contaminantes carregados para os corpos aquáticos na Ilha de São Luís, principalmente na área do Porto do Pau Deitado;
- as ostras apresentam qualidade higienicossanitária inadequada para o consumo e podem ser um importante veículo de patógenos de origem alimentar, como *A. hydrophila* e *E. coli*;
- as ostras podem ser utilizadas como um relevante bioindicador de contaminação aquática;
- a água dos locais de coleta de ostras está em conformidade com os padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação brasileira vigente, mas as análises biológicas (biomarcadores e microbiologia) indicam sinais iniciais de contaminação na região;
- a atividade extrativista de coleta da ostra representa uma importante fonte de renda para os marisqueiros, embora seja praticada por métodos artesanais, sem nenhum recurso tecnológico.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As constatações feitas neste trabalho possibilitaram indicar os seguintes aspectos:

- necessidade de implementação de políticas públicas direcionadas para a coleta de resíduos e esgotos, bem como a destinação e tratamento adequados;
- recomenda-se o monitoramento da qualidade sanitária das águas dos locais de extração de ostras na Ilha de São Luís-MA;
- considera-se necessário conter na legislação brasileira um padrão microbiológico para molusco bivalve consumido cru;
- os procedimentos adotados para a obtenção das ostras até chegar ao consumidor final precisam ser melhorados, visto que atualmente são precários, demonstrando deficiência nas condições higiênicas e sanitárias principalmente no armazenamento e conservação;

- os marisqueiros necessitam de orientação técnica para a adoção de práticas de manejo adequadas, e incentivo financeiro para implementarem melhorias no setor;
- urgência de se implantar programas educativos que visem a melhoria do grau de instrução dos marisqueiros e de boas práticas de manipulação de ostra.

8 REFERÊNCIAS

ABDULLAH, A. I.; HART, C. A.; WINSTANLEY, C. Molecular characterization and distribution of virulence associated genes amongst *Aeromonas* isolates from Libya. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p.1001-1007, 2003.

ABESSA, D. M. S.; RACHID, B. R. F.; MOSER, G. A. O.; OLIVEIRA, A. J. F. C. Efeitos ambientais da disposição oceânica de esgotos por meio de emissários submarinos: uma revisão. **O Mundo da Saúde**, v. 36, n. 4, p. 643-661, 2012.

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

AGNESE, A. P.; OLIVEIRA, V. M.; SILVA, P. P. O.; OLIVEIRA, G. A. Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas e Enumeração de Coliformes Totais e Fecais, em Peixes Frescos Comercializados no Município de Seropédica, RJ. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 88, p. 67-70, 2001.

ALVES, R. R.; NISHIDA, A. K. Aspectos socioeconômicos e formas de percepção ambiental dos catadores de caranguejo-uçá *Ucides Cordatus* (L.1763) (Decapoda, Brachyura) no estuário do rio Mamanguape. **Interciência**, v. 28, n.1, p. 36-43, 2003.

ALMEIDA, E. A.; BAINY, A. C. D.; LOUREIRO, A. P. M.; MARTINEZ, G. R.; MIYAMOTO, S.; ONUKI, J.; BARBOSA, L. F.; GARCIA, C. C. M.; PRADO, F. M.; RONSEIN, G. E.; SIGOLO, C. A.; BROCHINI, C. B.; MARTINS, A. M. G.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. 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**, v. 146, p. 588–600, 2007.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Committee on microbiological methods for foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: APHA, 2001, 676p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. APHA; AWWA; WEF Microbiological examination of water. In: Standard methods for the examination of water and wastewater. 21th ed. Washington, D. C: APHA, 2005,194p.

AMARAL, A. C. Z.; RIZZO, A. E.; ARRUDA, E. P. **Manual de identificação dos invertebrados marinhos da região Sudeste-Sul do Brasil**. v. 1. São Paulo: EDUSP, 2005. 288p.

ARAÚJO, R. M; ARRIBAS, R. M.; LUCENA F.; PARES R. Relation between *Aeromonas* and faecal coliforms in fresh waters. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 67, p. 213-217, 1989.

BABBITT, P. C. Reengineering the glutathione S-transferase scaffold: a rational design strategy pays off. **Proceeding National Academy Sciences**, v. 97, n. 19, p. 10293-10300, 2000.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARNABÉ, G. **Bases biológicas y ecológicas de la Acuicultura**. Zaragoza: ed. Acribia, 1996. 519p.

BASTI, A. A.; MISAGHI, A. ; SALEHI, T. Z. ; KAMBAR, A. Bacterial pathogens in fresh , smoked and salted Iranian fish. **Food Control**, v.17, p. 183-188, 2006.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. New York: Grune & Straton, 1975. 198p.

BERTIN G.; AVERBECK, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). **Biochimie**, v. 88, p.1549-1559, 2006.

BRAGA, H. F.; FERREIRA, I. M. Quibe cru: qualidade sanitária e perigo à saúde. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v.15, n. 4, p. 123-129, 2013.

BRASIL. Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981. Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 1981.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.62, 18 de setembro de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente do Ministério do Meio Ambiente. Alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011, dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2005.

BRITTO, F. B.; VASCO, A. N.; PEREIRA, A. P. S.; MÉLLO JÚNIOR, A. V.; NOGUEIRA, L. C. Herbicidas no alto rio Poxim, Sergipe e os riscos de contaminação dos recursos hídricos. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 390-398, 2012.

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

BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F.; NESSIMIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, n. 2, p.465-473, 2003.

BURKHARDT, W.; CALCII, K. R. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1375-1378, 2000.

CALLISTO, M.; MORETTI, M.; GOULART, M. Macroinvertebrados bentônicos como ferramenta para avaliar a saúde de riachos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 6, n. 1, p. 71-82, 2001.

CARAPETO, C. **Poluição das águas: causas e efeitos**. Universidade Aberta: Portugal, 1999. 243p.

CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to *in situ* tests in an urban stream in southern Brazil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, p. 61-69, 2006.

CARNAHAN, A. M.; BEHRAM, S.; JOSEPH, S. W. Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 2843-2849, 1991.

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.

CARVALHO, C. E. V.; CAVALCANTE, M. P. O.; GOMES, M. P.; FARIA, V. V.; REZENDE, C. E. Distribuição de metais pesados em mexilhões (*Perna perna*, L.) da Ilha de Santana, Macaé, SE, Brasil. **Ecotoxicology and Environmental Restoration**, v. 4, p. 1-5, 2001.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; ABREU-SILVA, A. L. *Sciades herzbergii* oxidative stress biomarkers: an *in situ* study of estuarine ecosystem (São Marcos' Bay, Maranhão, Brazil). **Brazilian Journal of Oceanography**, v.58, p.11-17, 2010.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; ABREU-SILVA, A. L. Glutathione S-Transferase as biomarker in *Sciades herzbergii* (Siluriformes: Ariidae) for environmental monitoring: the case study of São Marcos Bay, Maranhão, Brazil. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 2, p. 217-225, 2013.

CHRISTO, S. W.; ABSHER, T. M.; KOLM, H. E.; CRUZ-KALED, A. C. Qualidade da água em área de cultivo de ostras na Baía de Guaratuba (Paraná – Brasil). **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.14, n.1, p. 67-71, 2008.

CHRISTO, S. W. **Biologia reprodutiva e ecologia de ostras do gênero *Crassostrea sacco*, 1897 na Baía de Guaratuba (Paraná – Brasil): Um subsídio ao cultivo**. 2006. 146f. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2006.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M.; KANASHIRO, A. M. I.; GAMA, N. M. S. Q. Pesquisa de coliformes totais e coliformes fecais analisados em ovos comerciais no laboratório de patologia avícola de descavado. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n.1, p.19-22, 2001.

CANESI, L.; VIARENGO, A.; LEONZIO, C; FILIPPELLI, M.; GALLO, G. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. **Aquatic Toxicology**, v. 46, p. 67–76, 1999.

CHEUNG, C. C. C.; ZHENG, G. J.; Li, A. M. Y., RICHARDSON, B. J.; LAM, P. K. S. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*, **Aquatic Toxicology**, v. 52, p. 189-203, 2001.

COLLEY, E.; SIMONE, L. R. L.; SILVA, J. L. Uma viagem pela história da Malacologia. **Estudos de Biologia: Ambiente e Diversidade**, v. 34 n. 83, p.175-190, 2012.

COGO, A. J. D. ; SIQUEIRA, A. F.; RAMOS, A. C.; CRUZ, Z. M. A.; SILVA, A. G. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza On Line**, v.7, n. 1, p. 37-42, 2009. [on line]. Disponível em: <<http://www.naturezaonline.com.br>> Acesso em: 13 jul. 2014.

DOI, S. A.; BARBIERI, E.; MARQUES, H. L. A. Densidade colimétrica das áreas de extrativismo de ostras em relação aos fatores ambientais em Cananeia (SP). **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 19, n.2, p. 165-171, 2014.

DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 2 ed. Washington: Editora, 1997.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; SOUSA, O. V.; VIEIRA, R. H. S. F. Moluscos bivalves: Organismos Bioindicadores da Qualidade Microbiológica das Águas: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 2, n. 2, p. 17 – 29, 2008.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

FARIA, M.; CARRASCO, L. ; DIEZ, S.; RIVA, M. C.; BAYONA, J. M.; BARATA, C. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 149, p. 281–288, 2009.

FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborn disease. **Microbes and Infections**, v.2, p. 1651-1660, 2000.

FREIRE, M. M.; SANTOS, V. G.; GINUINO, I. S. F.; ARIAS, A. R. L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, n.3, p. 347-354. 2008.

GALLOWAY, T. S.; SANGER, R. C.; SMITH, K. L.; FILLMANN, G.; READMAN, J. W.; FORD, T. E.; DEPLEDGE, M. H. Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays. **Environmental Science and Technology**, v.36, p. 2219–2226, 2002.

GALVÃO, P. M. A.; REBELO, M. F.; TORRES, J. P. M.; GUIMARÃES, J. R. D.; MALM, O. Bioacumulação de metais em moluscos bivalves: aspectos evolutivos e ecológicos a serem considerados para a biomonitoração de ambientes marinhos. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v.13, n. 2, p. 59-66, 2009.

GHENGHESH, K. S.; AHMED, S. F.; EL-KHALEK, R. A.; AL-GENDY, A.; KLENA, J. *Aeromonas* associated infections in developing countries. **Journal Infect Developing Countries**, v. 2, n. 2, p.81-98, 2008.

GONÇALVES, R. S. L.; FREIRE, G. S. S.; NASCIMENTO - NETO, V. A. Determinação das concentrações de cádmio, cobre, cromo e zinco na ostra *Crassostrea rhizophorae* dos estuários dos rios Cocó e Ceará. **Revista de Geologia**, v. 20, n. 1, p. 57-63, 2007.

GÓMEZ-COUSO, H.; FREIRE-SANTOS F.; MARTÍNEZ-URTAZA J.; GARCÍA-MARTÍN O.; ARES-MAZÁS M. E. Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: the need for new quality control standards. **International Journal of Food Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 97-105, 2003.

HÄNNINEN, M.-L.; OIVANEN, P.; HIRVELÄ-KOSKI, V. *Aeromonas* species in fish, fish-eggs, shrimp and freshwater. **International Journal of Food Microbiology**, v.34, n. 1, p.17-26, 1997.

HAMZA - CHAFFAI, A. Usefulness of Bioindicators and Biomarkers in Pollution Biomonitoring. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 3, p. 19-26, 2014.

HAYES J. D.; PULFORD D. J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.30, p. 445–600, 1995.

HIRAI, C. K. Indicadores Microbiológicos da Qualidade Microbiológica da água. **Revista Analytica**, v. 1, n. 66, p. 8, 2013.

HOLT, E. A.; MILLER, S. W. Bioindicators: using organisms to measure environmental impacts. **Nature Education Knowledge**, v. 2, p. 8, 2010.

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

HUSS, H.H. Garantia da qualidade dos produtos da pesca. Roma, FAO. 1997. 176p.

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

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

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/uf.php?lang=&coduf=21&search=maranhao>> Acesso em 27 jan. 2014.

IRIARTE, R. M. M.; RENGEL, A. Microbiological quality indicators of *Crassostrea rhizophorae* and Las Marites Lagoon water, Margarita Island, oyster. **Memoria de la Sociedad de Ciencias Naturales La Salle**, v.57, n.147, p. 93-108. 1997.

IVANINA, A.V.; HABINCK, E.; SOKOLOVA, I. M. Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica Gmelin* (Bivalvia: Ostreidae). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.148, p.72-79, 2008.

IWAMOTO, M.; AYERS, T.; MAHON, B. E.; SWERDLOW, D. L. Epidemiology of Seafood-Associated Infections in the United States. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23 n. 2, p. 399-411, 2010.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. 2, p. 332-344, 1998.

LEAL, D. A. G.; FRANCO, R. M. B. Moluscos bivalves destinados ao consumo humano como vetores de protozoários patogênicos: metodologias de detecção e normas de controle. **Revista Panamericana de Infectología**, v.10, p. 48-57, 2008.

LEMOS, M.; FERREIRA NETO, M.; DIAS, N. S. Sazonalidade e variabilidade espacial da qualidade da água na Lagoa do Apodi, RN. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 2, p. 155-164, 2010 .

LIJTEROFF, R.; LIMA, L. PRIERI, B. Uso de líquenes como bioindicadores de contaminación atmosférica en la ciudad de San Luis, Argentina. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v. 25, n.2. p. 111-120, 2009.

LUCAS, A.; BENINGER, P. G. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. **Aquaculture**, v. 44, p. 187-200, 1985.

MACHADO, I. C.; PAULA, A. M. R.; BUZZO, A.; JAKABI, M.; RISTORI, C.; SAKUMA, H. Estudo da ocorrência de contaminação orgânica no estuário de Cananéia, como subsídio para a extração, manejo e cultivo da ostra do mangue (*Crassostrea brasiliana*). Análise da ostra (tecidos moles e líquido intervalvar). **Revista Higiene Alimentar**, v.15, n.83, p.44-48, 2001.

MACHADO, I. C.; MAIO, F. D. ; KIRA, C. S.; CARVALHO, M. F. H. Estudo da ocorrência dos metais pesados Pb, Cd, Hg, Cu e Zn na ostra de mangue *Crassostrea brasiliana* do estuário de Cananéia-SP, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 61, n.1, p.13-18, 2002.

MALOUF, R. E.; BREESE, W. P. As mudanças sazonais nos efeitos da temperatura e vazão de água sobre o crescimento de juvenis do Pacífico Ostras, *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Aquicultura**, v.12, p. 1-13, 1977.

MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E. et al (Eds.). **A bacia do Rio Tibagi**. Londrina-Paraná: UFPR, parte C, p. 551-577, 2002.

MAJEED, K. N.; EGAN, A. F.; MACRAE, I. C. Enterotoxigenic aeromonads on retail lamb meat and offal. **Journal of Applied bacteriology**, v. 67, p.165-170, 1990.

MANESCHY, M. C. Pescadores nos manguezais: estratégias técnicas e relações sociais de produção na captura do caranguejo. In: FURTADO, L. G.; LEITÃO, W.; FIÚZA, A. (ed). **Povos das Águas: Realidade e Perspectivas na Amazônia**. Belém, Brasil: MCT/CNPQ, p 19-62, 1993.

MELLO, A. G.; GAMA, M. P.; MARIN, V. A.; COLARES, L. G. T. Conhecimento dos manipuladores de alimentos sobre boas práticas nos restaurantes públicos populares do Estado do Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. 1, p. 60-68, 2010.

MONTELES, J. S.; CASTRO, T. C. S.; VIANA, D. C. P.; CONCEIÇÃO, F. S.; FRANÇA, V. L.; FUNO, I. C. S. A. Percepção sócio-ambiental das marisqueiras no município de Raposa, Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 4, n. 1, p. 34-45, 2009.

MONTELES J. S.; FUNO, I. C. A.; CASTRO, A. C. L. Caracterização da pesca artesanal nos municípios de Humberto de Campos e Primeira Cruz – Maranhão. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, v.23, p. 65-74, 2010.

MONSERRAT, J. M.; MARTÍNEZ, P. E.; GERACITANO, L. A.; AMADO, L. L.; MARTINS, C. M.; PINHO, G. L.; CHAVES I. S.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J.; BIANCHINI A. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology**. C, Toxicology & Pharmacology, v. 146, p. 221-234, 2007.

NASCIMENTO, V. A.; MITTARAQUIS, A. S. P.; TRAVÁLIA, B. M.; SANTOS, R. C. A.; NUNES, M. L.; AQUINO, L. C. L. de A. Qualidade Microbiológica de Moluscos Bivalves - Sururu e Ostras submetidos a tratamento térmico e estocagem congelada. **Scientia Plena**, v. 7, n. 4, p. 1-5, 2011.

NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A.; LEITE, M. B. N. L. **Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição**. In: ZAGATTO, P. A., BERTOLETTI, E. (Ed.). Ecotoxicologia aquática – Princípios e aplicações. São Carlos: Editora Rima 2006. p. 413-432.

NIYOGI, S.; BISWAS, S.; SARKER, S.; DATTA, A. G. Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences. **The Science of the Total Environment**, v. 281, p. 237-246, 2001.

NUSETTI, O.; ESCLAPES, M.; SALAZAR, G.; NUSETTI, S.; PULIDO, S. Biomarkers of oxidative stress in the *polychaete Eurythoe complanata* (Amphinomidae) under short-term copper exposure. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 66, p. 576-581, 2001.

PALUMBO, S. A.; WILLIAMS, A. C.; BUCHANAN, R. L.; PHILLIPS, J. G. Model for anaerobic growth of *Aeromonas hydrophila* K144. **Journal of Food Protection**. v. 55, n. 4, p. 260-265, 1991.

PARISENTI, J.; TRAMONTE, V. L. C. G.; ARELLANO, D. B. Composição de esteróis e ácidos graxos de ostras (*Crassostrea gigas*) cultivadas em Florianópolis - SC, em duas estações do ano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n.1, p. 73-76, 2010.

PEIXOTO, J. S.; SÁ, M. C. A.; GORDIANO, L. A.; COSTA, M. M. *Aeromonas* spp.: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.79, n.3, p.453-461, 2012.

PEREIRA, C. S.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. Vibrios patogênicos em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) servidas em restaurantes no Rio de Janeiro: um alerta para a Saúde Pública. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.3, p. 300-303, 2007.

PEREIRA, M. A.; NUNES, M. M.; NUERNBERG, L.; SCHULZ, D.; BATISTA, C. R. V. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis – Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n.2, p. 159-163, 2006.

PEREIRA, R. S. Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. **Revista Eletrônica de Recursos Hídricos**. IPH – UFRGS. v. 1, n. 1. p. 20-36, 2004. Disponível em: <<http://www.abrh.org.br/informacoes/rerh.pdf>>. Acesso em: 13 jul. 2014.

PIEDRAS, S. R. N.; BAGER, A.; MORAES, P. R. R.; ISOLDI, L. A.; FERREIRA, O. G. L.; HEEMANN, C. Macroinvertebrados bentônicos como indicadores de qualidade de água na Barragem Santa Bárbara, Pelotas, RS. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 494-500, 2006.

POTASMAN, I.; PAZ, A.; ODEH, M. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: A worldwide perspective. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p.921-928, 2002.

PRADE, L.; HUBER, R.; MANOHARAN, T. H.; FAHL, W. E.; REUTER, W. Structures of class pi glutathione S-transferase from human placenta in complex with substrate, transition-state analogue and inhibitor. **Structure**, v. 5, n. 10, p. 1287–1295, 1997.

RADTKE, R. L. The mummichog: a fish for all reasons. **Sea Frontiers**, v. 5, p. 145-149. 1979.

RAMOS, R. J.; PEREIRA, M. A.; MIOTTO, L. A.; FARIA, L. F. B., SILVEIRA-JUNIOR, N.; VIEIRA, C. R. W. Microrganismos indicadores de qualidade higiênico-sanitária em ostras (*Crassostrea gigas*) e águas salinas de fazendas marinhas localizadas na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 1, p. 29-37, 2010.

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

RUPPERT, E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6 ed. São Paulo: Roca, 1996. 1029 p.

SÁ, E. Conservação do Pescado. **Revista Aquicultura e Pesca**, v.1, n. 1, p. 20-26, 2004.

SAAD, S. M.; IARIA, S. T.; FURLANETTO, S. M. P. Motile *Aeromonas* spp. in retail vegetables from São Paulo, Brazil. **Revista Microbiologia**, v. 26, n. 1, p. 22-27, 1995.

SANDE, D.; MELO, T. A.; OLIVEIRA, G. S. A.; BARRETO, L.; TALBOT, T.; BOEHS, G.; ANDRIOLI, J. L. Prospecção de moluscos bivalves no estudo da poluição dos rios Cachoeira e Santana em Ilhéus, Bahia, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 3, p. 190-196, 2010.

SANTOS, C. A. M. L.; VIEIRA, R. H. S. F. Bacteriological hazards and risks associated with seafood consumption in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n.4, p. 219-228, 2013.

SANTOS, R. B.; CARVALHO-NETA, R. N. F.; ALMEIDA, Z. S. Características da pesca artesanal em três comunidades da Ilha de São Luís, Maranhão. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, v. 16, p. 55-65, 2003.

SILVA, A. C. M. M.; NASCIMENTO, D. L.; MACHADO, R. Z.; COSTA, F. N. Caracterização de *Aeromonas* spp. isoladas de amostras de ostras e água por método microbiológico e molecular. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.15, n.3, p. 362-368, 2014.

SILVA, M. R.; CAMPOS, A. C. E.; BOHM, F. Z. Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. **Revista de Saúde e Biologia**, v.8, n.2, p.46-58, 2013.

SILVA, A. Z.; ZANETTE, J.; FERREIRA, J. F.; GUZENSKI, J.; MARQUES, M. R. F.; BAINY, A. C. D. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p. 376–382, 2005.

SISINNO, C. L. S.; MACHADO, J. P. **Avaliação ambiental**. In: _____; OLIVEIRA – FILHO, E. C. T. (Org.). Princípio de toxicologia ambiental. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2013.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P.; KANASHIRO, A. M. I.; STOPPA, G. F. Z.; LUCIANO, R. L.; CASTRO, A. G. M. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos industrialmente processadas, procedentes de explorações industriais do Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 38, n.9, p. 2557-2560, 2008.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington: American Public Health Association, 1992, 1219p.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p.57-149, 2003.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 178–189, 2006.

VENTURA, E. C.; GAELZER, L. R.; ZANETTE, J.; MARQUES, M. R. F.; BAINY, A. C. D. Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three estuaries of Rio de Janeiro coast. **Marine Environmental Research**, v. 54, p. 775-779, 2002.

VIEIRA, R. H. S. F.; SILVA, A. I. M.; SOUSA, O. V. S.; HOFER, E.; VIEIRA, G. H. F.; SAKER-SAMPAIO, S.; LIMA, E. A. Análise experimental sobre a viabilidade de *Escherichia coli* em água do mar. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 34, p. 43-48, 2001.

VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado - teoria e prática**. São Paulo: Varela, 2004.

VIEIRA, R. H. S. F.; ATAYDE, M. A.; CARVALHO, E. M. R.; CARVALHO, F. C. T.; FONTELES FILHO, A. A. Contaminação fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* e da água de cultivo do estuário do Rio Pacoti (Eusébio, Estado do Ceará): Isolamento e identificação de *Escherichia coli* e sua susceptibilidade a diferentes antimicrobianos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 3, p. 180-189, 2008.

WELKER, C. A. D.; BOTH, J. M. C.; LONGARAY, S. M.; HAAS, S.; SOEIRO, M. L. T.; RAMOS, R. C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, p. 44-48, 2010.

WINSTON, G. W.; GIULIO, R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v.19, p. 137-161, 1991.

ZANETTE, J.; NUNES, F. F.; MEDEIROS, I. D.; SIEBERT, M. N.; MATTOS, J. J.; LÜCHMANN, K. H.; MELO, C. M. R.; BAINY, A. C. D. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environmental Research**, v. 66, p. 196–198, 2008.

ZANETTE, J.; ALMEIDA, E. A.; SILVA, A. Z.; GUZENSKI, J.; FERREIRA, J. F.; DI MASCIO, P. D.; MARQUES, M. R. F.; BAINY, A. C. D. Salinity influences glutathione S-transferase activity and lipid peroxidation responses in the *Crassostrea gigas* oyster exposed to diesel oil. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 1976–1983, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Questionário aplicado aos marisqueiros (as) na Ilha de São Luís (MA).



Universidade Estadual do Maranhão
Centro de Ciências Agrárias
Mestrado em Ciência Animal

Termo de Consentimento Prévio e Esclarecido

Entrevistadora: Sou Mestranda em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão, em São Luís, e estou desenvolvendo um trabalho sobre conhecimento tradicional relacionado com a cadeia produtiva de ostras nas comunidades pesqueiras da Ilha de São Luís (MA), que abrange os Municípios de São Luís, Paço do Lumiar, São José de Ribamar e Raposa. O objetivo deste trabalho é analisar o conhecimento que você possui sobre a bioecologia de ostras e a forma como tem sido comercializado este marisco aqui na região. Mas para que esse trabalho possa ser realizado e possamos analisar esse conhecimento, gostaríamos de pedir autorização para entrevistá-lo e relatar o conhecimento que será registrado, assim como realizar algumas fotografias. A qualquer hora você pode parar a nossa conversa ou desistir de participar do trabalho, sem trazer nenhum prejuízo. É importante destacar que não tenho nenhum objetivo financeiro e que os resultados desta pesquisa serão repassados a você e só serão utilizados para comunicar outros pesquisadores e revistas relacionadas à universidade.

Endereço e telefone para contato: Curso de Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, Campus Paulo VI, Tirirical, São Luís, MA, CEP 65055970. Telefone (98) 3257-3676.

Entrevistado: Depois de saber o que é a pesquisa, de como será feita, do direito que tenho de não participar ou desistir dela sem prejuízo para mim e de como os resultados serão usados, eu concordo em participar desta pesquisa.

Data: ____/____/____

Entrevistado

Entrevistador

Data ____/____/____ Município: () São Luís () Paço do Lumiar () Raposa () São José de Ribamar

DADOS PESSOAIS:

Nome _____

Apelido: _____ Naturalidade: _____

Local de moradia: () São Luís () Paço do Lumiar () Raposa () São José de Ribamar

Nome do Bairro /Comunidade _____ Sexo: () M () F

Idade: _____

Atividade principal de renda: _____

Atividade secundária de renda: _____

Estado civil: () Casado () Vive junto/U. Estável () Solteiro () Viúvo
Outra _____

Quantas pessoas têm na sua família?

Qual o seu nível de escolaridade: Ensino fundamental: () Completo () Incompleto

Ensino Médio: () Completo () Incompleto () Sem alfabetização () Só assina o nome

Parou de estudar, por quê? _____

Moradia () Casa própria () Alugada () De algum parente

Casa de madeira () Casa de Alvenaria ()

Possui Luz elétrica: () Sim () Não

Banheiro: () Dentro () Fora

Água encanada: () Sim () Não

Drenagem pluvial (esgoto): () Sim () Não

Fossa seca ou fossa séptica: () Sim () Não

-Tem registro em alguma entidade de classe (colônia, associação, cooperativa)? () Não () Sim

Qual? _____ Desde quando? _____

-Desde quando é marisqueiro? _____

-Além da ostra, que outras espécies você coleta? _____

DADOS ECONÔMICOS:

Renda

Além de você, quem mais na sua família trabalha? () Só o entrevistado

Outra _____

E com qual atividade? _____

Renda obtida com a venda de ostras: () 1 salário mín. (R\$ 724,00) () 1 e meio a 2 sal.

Outra _____

Renda obtida com a outra atividade: () 1 salário mín. (R\$ 724,00) () 1 e meio a 2 sal.

Outra _____

Para quem você vende ostras? () atravessadores () banhistas () turistas () donos de bares

DADOS AMBIENTAIS

O local de coleta Cultivo () Banco natural ()

Onde fica? _____

Há quanto tempo está nesse ponto de coleta? _____

Onde coletava antes? _____

Porque mudou? _____

Você compra ostra de outros lugares? () Não () Sim. Onde? _____

Quais pontos de coletas você conhece? Onde fica? _____

Quantas vezes por semana faz a coleta de ostras? () 1 por semana () 2 () 3

Quais são os dias da coleta? () Seg. () Terç () Quar () Quin () Sex () Sáb. () Dom.

Em que dia (s) vende as ostras? () Seg. () Terç () Quar () Quin () Sex () Sáb. () Dom.

Qual o horário da coleta? Por quê? _____

Qual o melhor período (meses) do ano para a coleta de ostras? (Seco ou chuvoso) Por quê? _____

Tem algum período em que não faz coleta? () Não () Sim. Quando e por quê? _____

Qual a quantidade de ostras capturadas por coleta? _____

Existe um tamanho mínimo para você coletar as ostras? _____

Tem algum critério para escolher as ostras que serão coletadas? _____

Você percebe algum tipo de poluição nos locais de coleta? () Não () Sim.

Se sim quais? _____

Quem são os responsáveis pela poluição nos locais em que faz a coleta? _____

Que outros problemas ambientais você observa na área de coleta? _____

Você percebeu se aumentou o número de marisqueiros nos últimos 10 anos? () Não () Sim

Se sim por quê? _____

Você percebeu alguma mudança (aumento ou diminuição) na quantidade de ostras / na quantidade de pontos de coleta? _____

Você percebeu alguma mudança no tamanho das ostras? () Não () Sim. Qual? _____

Procedimentos desde a captura a até a 1ª comercialização

Como faz a coleta das ostras? Quais materiais / equipamentos você utiliza?

Depois da coleta faz algum tratamento antes de vender? Qual? _____

Quanto tempo (horas) nesse processo? _____

Como você armazena e conserva as ostras? _____

De onde vem o gelo que você usa? () feito em casa () compra feito

Quanto tempo leva para vender todas as ostras coletadas? () 1 dia () 2 dias () 3 dias Outra _____

Quais os locais onde você vende as ostras? _____

Você conhece os cuidados pessoais de higiene necessários que o vendedor de ostras (ostreiro) deve ter?

Quais são? _____

APÊNDICE B – (A) Local de extração de ostras no Porto do Cumbique; B) Procedimento de corte do mangue para a coleta das ostras, Porto do Pau Deitado, Ilha de São Luís, 2014.



APÊNDICE C – Acondicionamento de ostras em sacos de ráfia, Porto do Braga, Raposa -MA, 2014.



APÊNDICE D – Comercialização de ostras *Crassostrea* sp. na praia do Araçagi, Ilha de São Luís - MA, 2014.



ANEXOS

ANEXO A – Autorização de pesquisa científica expedida pela Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Recursos Naturais – SEMA/MA

ESTADO DO MARANHÃO
SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS
SECRETARIA ADJUNTA DE RECURSOS AMBIENTAIS
SUPERINTENDÊNCIA DE BIODIVERSIDADE E ÁREAS PROTEGIDAS




AUTORIZAÇÃO DE ÓRGÃO GESTOR DE UNIDADE DE CONSERVAÇÃO ESTADUAL		
Nº da Autorização 003/2014	Nº do Processo SEMA 21504/2014	Período de Validade Maio de 2014 a Janeiro de 2015
Objeto () Prosseguimento de Processo de Licenciamento Ambiental (X) Pesquisa Científica () Manejo da Natureza () Atividades Didáticas () Atividades Sócio-Culturais () Visitação	Descrição PROJETO: Ostra como Bioindicador de Poluição Aquática: Utilização de Biomarcadores e Análise Microbiológica para Validação do Potencial Indicador de Poluentes Ambientais.	
Localização Área de Proteção Ambiental de Upaon-Açu / Miritiba / Alto Preguiças;		
Responsável (Pesquisador/Coordenador) Nome: Eliane Braga Ribeiro CPF: 711.805.163-20 Nº Identidade: 043177442011-5 Endereço: Rua São José Q 03, Casa 16A – Santa Clara São Luís-MA CEP: 65058544. Telefone: (98) 32573439 - Celular: (98) 87017746/82556145. Email: elianeribeiro.biologa@gmail.com Profissão: Bióloga Registro no Conselho: CRBio: 59836/05-D Cadastro Técnico Federal-CTF 2935757		
Instituição Nome: Universidade Estadual do Maranhão Endereço: Cidade Universitária Paulo VI, CP 09, Tirirical – São Luís – MA – CEP 65055970 CNPJ/CPF: 06.352.421/0001-68.		
Haverá coleta de material biológico? (X) SIM () NÃO SISBIO: 43813-1		
FAMÍLIA	NOME COMUM	QUANTIDADE
Ostreidae	Ostra do Mangue	80 dúzias, observando as condicionantes
Data e Local da Emissão São Luís, 22 de maio de 2014	Autoridade Expedidora (Assinatura e Carimbo)  Genilde Campagnaro Secretária de Estado de Meio Ambiente e Recursos Naturais/SEMA	
AUTORIZAÇÃO VÁLIDA SOMENTE SEM EMENDAS OU RASURAS		
AS CONDICIONANTES DESTA AUTORIZAÇÃO ESTÃO LISTADAS NO VERSO		
1ª VIA: INTERESSADO	2ª VIA: PROCESSO	3ª VIA: ARQUIVO INTERNO

Esta Autorização encontra-se em conformidade com a Portaria nº 31 do dia 07 de março de 2012 desta SEMA publicada no DOE do dia 22 de março de 2012.