



Uema
UNIVERSIDADE ESTADUAL
DO MARANHÃO



**Programa de
Pós-graduação**
em Ecologia e
Conservação da
Biodiversidade

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO - UEMA
CENTRO DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS – CECEN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA – DBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA
BIODIVERSIDADE -PPGECB**

GEANE DA SILVA CASTRO

**AVALIAÇÃO DOS IMPACTOS AMBIENTAIS ATRAVÉS DAS RESPOSTAS
BIOQUÍMICAS EM OSTRAS *Crassostrea sp.* (BIVALVIA, OSTREIDAE) NA BAÍA
DE SÃO JOSÉ- MARANHÃO**

São Luís – MA
2024

GEANE DA SILVA CASTRO

**AVALIAÇÃO DOS IMPACTOS AMBIENTAIS ATRAVÉS DAS RESPOSTAS
BIOQUÍMICAS EM OSTRAS *Crassostrea sp.* (BIVALVIA, OSTREIDAE) NA BAÍA
DE SÃO JOSÉ– MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade como requisito para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação da Biodiversidade.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. SandraFernanda Loureiro de Castro Nunes
Co-Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Lígia Tchaicka

Castro, Geane da Silva .

Avaliação dos impactos ambientais através das respostas bioquímicas em ostras *Crassostrea sp.* (Bivalvia, Ostreidae) na baía de São José - Maranhão./ Geane da Silva Castro – São Luís, 2023.

81.f.

Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação da Biodiversidade.) - Universidade Estadual do Maranhão, 2023.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Fernanda Loureiro de Castro Nunes.

1.Biometria. 2.Nitritos. 3.Ostras. 4.Parâmetros físico-químicos. I.Título.

CDU: 502:564.1(812.1)

GEANE DA SILVA CASTRO

**AVALIAÇÃO DOS IMPACTOS AMBIENTAIS ATRAVÉS DAS RESPOSTAS
BIOQUÍMICAS EM OSTRAS *Crassostrea sp.* (BIVALVIA, OSTREIDAE) NA BAÍA
DE SÃO JOSÉ- MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação da Biodiversidade.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. SandraFernanda Loureiro de Castro Nunes
Co-Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Lígia Tchaicka

Aprovada em: _____ / _____ / _____

Banca examinadora

Prof^a. Dr^a. Sandra Fernanda Loureiro de Castro Nunes
Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade (UEMA)

Prof^a. Dr^a. Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta
Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade (UEMA)

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (UFMA)

Dedico

*À minha mãe, Doralice Araújo da Silva
pelo grande amor e esforço intenso para
que esse sonho se tornasse realidade. A
ela minha eterna gratidão e meu eterno
amor ...*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela força para realizar este trabalho.

À minha família, que me apoiou e ajudou durante toda a trajetória. Em especial, à minha mãe, Doralice, e meu pai, Mariano (in memoriam) que mesmo não estando mais entre nós, cuida de mim lá de cima. Amo vocês!

À minha irmã, Ana Paula, que sempre esteve comigo, apoiando-me e incentivando. Amo você!

Aos meus sobrinhos, Bia e Biel, por me fazerem muito feliz e me tirarem um pouco do estresse. Amo muito vocês!

Ao meu companheiro de vida, Rodrigo, pelo incentivo e apoio. Caminhar ao seu lado fez a jornada ficar mais “leve”. Amo você!

Às minhas tias, Carmem e Candinha, que me deram suporte em toda minha vida acadêmica, me compreendendo e me apoiando.

À minha orientadora Professora Sandra Fernanda Loureiro pelos ensinamentos, motivação, paciência, compreensão e pela grande oportunidade da realização desse trabalho.

À minha co-orientadora Lígia Tchaicka pela ajuda no trabalho, principalmente na identificação molecular e nas coletas, obrigada pela motivação e paciência.

À professora Sildiane pela ajuda na estatística do trabalho e correção do artigo, obrigada pela orientação e motivação.

À minha prima, Josyana, pelo apoio e incentivo durante toda a minha trajetória.

À minha amiga, Karla, pelo incentivo, apoio e pelas palavras que me confortaram em dias difíceis. Você é muito especial em minha vida, agradeço por estar ao meu lado sempre.

Aos meus amigos de vida, Paula, Joseane, Débora, Felipe e Valéria que sempre entenderam meus dias de ausência e muitas vezes minha falta de paciência. Agradeço por sempre estarem comigo.

Aos meus amigos e colegas de sala que sempre torceram por mim e me apoiaram no decorrer do mestrado, em especial a Rayssa Guimarães. Passamos muitos momentos juntas nessa caminhada, e criamos uma linda amizade, sempre apoiando uma à outra. Obrigada por tudo!

À Nathália e Wallace por sempre estarem comigo nas coletas, obrigada!

À Karen, por me ajudar a coletar as ostras do cultivo, sem sua ajuda não seria possível incluir essa área no trabalho. Muito obrigada!

À Aline por me ajudar nos procedimentos laboratoriais e nas coletas, muito obrigada.
Ao grupo LaBioEcotox pelo apoio e incentivo constante em toda a pesquisa. Ao Laboratório LaBiMol pela grande parceria e apoio na pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade (PPGECB), por todos os ensinamentos durante o curso.

Ao Programa de Mestrado PPGECB, por ter acreditado em mim e me apoiado

À Universidade Estadual do Maranhão, pela minha formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Aos funcionários da Biblioteca Central da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), pela colaboração na realização da ficha catalográfica.

Aos pescadores, pela ajuda nas coletas no município de Raposa.

Obrigada a todos que contribuíram e torceram por mim durante essa minha jornada!

“Descobrir como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer.”

(Amyr Klink)

RESUMO

As respostas dos organismos como ferramenta de monitoramento ambiental vem sendo utilizado por meio de organismos sensíveis a alterações que ocorrem no meio. Dentre os organismos utilizados como biomonitores, destacam-se as ostras, que acumulam grandes quantidades de contaminantes nos seus tecidos. Nesse sentido, essa pesquisa teve como objetivo determinar os parâmetros físico-químicos da água do mar em três pontos na Baía de São José, Maranhão - Brasil, realizar a biometria das ostras do gênero *Crassostrea*, avaliar o impacto antrópico por meio da quantificação dos nitritos (NO₂) e identificar as espécies de ostras por meio de análise molecular. Para isso, foram coletadas ostras do gênero *Crassostrea* no período seco em outubro de 2022 e chuvoso em março de 2023 em três pontos na Baía de São José, ponto S1 (cultivo- Raposa), S2 (extrativismo - Paço do Lumiar) e S3 (área urbana- São José de Ribamar). Durante o momento de cada coleta (maré baixa), foram registrados os parâmetros físico-químicos da água em todos os pontos de amostragem e comparados com a Resolução do CONAMA N° 357/2005, foi coletado também 2 ml da água do mar nos três pontos de amostragem para a quantificação de NO₂. O nitrito presente no sobrenadante das ostras foi analisado indiretamente através da reação de Griess, que quantifica os nitritos. Para a análise molecular, foi utilizada técnica de extração de DNA pelo protocolo salino e a Reação em Cadeia da Polimerase. As análises dos parâmetros físico-químicos da água do mar demonstraram que o pH e a temperatura mantiveram-se dentro dos limites estabelecidos, exceto no período chuvoso na área de extrativismo. A concentração do oxigênio dissolvido manteve-se baixa nos pontos S2 e S3. Na análise biométrica, é possível observar que as ostras do extrativismo são menores em todas as dimensões, principalmente no período chuvoso. O resultado da quantificação de nitrito no sobrenadante das ostras revelaram concentrações significativamente maiores na área de extrativismo (período seco $0,41 \pm 0,7$ mg/L e período chuvoso $0,28 \pm 0,11$ mg/L), mostrando que essa área é a mais impactada. Em relação a identificação molecular, foi possível observar padrão de bandas que correspondem a *Crassostrea gasar* e *Crassostrea rhizophorae*. Sendo assim, os resultados encontrados indicam que a quantificação de nitritos é uma ferramenta inovadora, simples, eficaz e de baixo custo que pode ser utilizada no monitoramento ambiental somados aos parâmetros físico-químicos da água e análise biométrica.

Palavras-chave: Biometria. Nitritos. Ostras. Parâmetros físico- químicos.

ABSTRACT

The responses of organisms as an environmental monitoring tool have been used by organisms sensitive to changes that occur in the environment. Among the organisms used as biomonitors, oysters stand out, which accumulate large amounts of contaminants in their tissues. In this sense, this research aimed to determine the physical-chemical parameters of seawater at three points in São José Bay, Maranhão - Brazil, perform biometry of oysters of the genus *Crassostrea*, evaluate the anthropic impact through the quantification of nitrites (NO₂) and identify oyster species through molecular analysis. For this, oysters of the genus *Crassostrea* were collected in the dry season in October 2022 and the rainy season in March 2023 at three points in São José Bay, point S1 (cultivation - Raposa), S2 (extractivism - Paço do Lumiar) and S3 (urban area- São José de Ribamar). During the time of each collection (low tide), the physical-chemical parameters of the water were recorded at all sampling points and compared with CONAMA Resolution No. 357/2005, 2 ml of seawater was also collected at the three sampling points for NO₂ quantification. The nitrite present in the oysters' supernatant was analyzed indirectly through the Griess reaction, which quantifies nitrites. For molecular analysis, DNA extraction techniques using the saline protocol and the Polymerase Chain Reaction were used. Analyses of the physical-chemical parameters of seawater demonstrated that pH and temperature remained within established limits, except during the rainy season in the extractive area. The concentration of dissolved oxygen remained low at points S2 and S3. In the biometric analysis, it is possible to observe that oysters from extractivism are smaller in all dimensions, especially in the rainy season. The result of nitrite quantification in the oyster supernatant revealed significantly higher concentrations in the extraction area (dry period 0.41 ± 0.7 mg/L and rainy period 0.28 ± 0.11 mg/L), showing that this area is the most impacted. Regarding molecular identification, it was possible to observe a pattern of bands that correspond to *Crassostrea gasar* and *Crassostrea rhizophorae*. Therefore, the results found indicate that the quantification of nitrites is an innovative, simple, effective and low-cost tool that can be used in environmental monitoring in addition to the physical-chemical parameters of water and biometric analysis.

Keywords: Biometry. Nitrites. Oysters. Physical-chemical parameters.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Mapa com a localização geográfica da Baía de São José, Maranhão, indicando os três locais de coleta de ostras: S1) Ponto de cultivo (município de Raposa); S2) Ponto de extrativismo (município de Paço do Lumiar); S3) Ponto de área urbana (São José de Ribamar). 28
- Figura 2** - Locais de coleta, em A) Área 1, Cultivo- Raposa (MA), em B), Área 2, Extrativismo- Paço do Lumiar (MA) e em C), Área 3, São José de Ribamar (MA). .. 29
- Figura 3** - Ostra do gênero *Crassostrea* sp coletada na Baía de São José, Maranhão. 30
- Figura 4** - Esquema de medição biométrica *das ostras* do gênero *Crassostrea* sp.. 31
- Figura 5** - Retirada de tecido de ostras coletadas na Baía de São José. 33
- Figura 6** - Retirada do sobrenadante das ostras coletadas na Baía de São José, MA. 34
- Figura 7** - Curva de calibração obtida por regressão linear. Equação da reta ($y=0,9292x-0,0438$. R^2 0,9981). 33
- Figura 8** - Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio mostrando as ampliações gerada pelo PCR Multiplex (poço A, *Crassostrea gigas*; poço B, *Crassostrea* sp. Canela; poço C e D, *C. gasar*; poço E e F, *C. rhizophorae*). 35
- Figura 9** - Média do peso total das ostras coletadas na Baía de São José no período seco (outubro de 2022) e chuvoso (março de 2023): S1) Área de cultivo (município de Raposa); S2) Área de extrativismo (município de Paço do Lumiar); S3) Área urbana (São José de Ribamar). A e B diferenças estatísticas do ponto entre as estações. a e b diferença estatística entre os pontos na mesma estação. 39
- Figura 10** - Média da altura das ostras coletadas na Baía de São José no período seco (outubro de 2022) e chuvoso (março de 2023): S1) Área de cultivo (município de Raposa); S2) Área de extrativismo (município de Paço do Lumiar); S3) Área urbana (São José de Ribamar). A e B diferenças estatísticas do ponto entre as estações. a, b e c diferença estatística entre os pontos na mesma estação. 40
- Figura 11** - Média do comprimento das ostras coletadas na Baía de São José no período seco (outubro de 2022) e chuvoso (março de 2023): S1) Área de cultivo (município de Raposa); S2) Área de extrativismo (município de Paço do Lumiar); S3) Área urbana (São José de Ribamar). A e B diferenças estatísticas do ponto entre as estações. a e b diferença estatística entre os pontos na mesma estação. 41
- Figura 12** - Média largura das ostras coletadas na Baía de São José no período seco (outubro de 2022) e chuvoso (março de 2023): S1) Área de cultivo (município de Raposa); S2) Área de extrativismo (município de Paço do Lumiar); S3) Área urbana (São José de Ribamar). A e B diferenças estatísticas do ponto entre as estações. a e b diferença estatística entre os pontos na mesma estação. 42
- Figura 13** – Média da concentração de nitritos no sobrenadante de ostras coletadas na Baía de São José no período seco (outubro de 2022) e no período chuvoso

(março de 2023): S1) Área de cultivo (município de Raposa); S2) Área de extrativismo (município de Paço do Lumiar); S3) Área urbana (São José de Ribamar). A e B diferenças estatísticas do ponto entre as estações. a e b diferença estatística entre os pontos na mesma estação. 44

Figura 14 – Gel de agarose a 1% corado com gel red mostrando ampliações obtidas pela PCR multiplex. A) amostra amplificada do ponto S2 (Extrativismo-Paço do Lumiar) correspondente a *Crassostrea rhizophorae*. B) amostra amplificada do ponto S3 (São José de Ribamar) correspondente a *Crassostrea gasar*. 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de amostras de ostras obtidas por ponto de coleta na Baía de São José no período de Outubro de 2022 e Março de 2023.....	32
Tabela 2 - Dados abióticos registrados em três pontos da Baía de São José-MA, no período de estiagem e chuvoso	36
Tabela 3 – Leitura da quantificação de nitritos na água do mar na Baía de São José-MA no período seco (outubro de 2022) e no período chuvoso (março de 2023)	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Adenosina Tri-Fosfato
CAT	Catalase
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GST	Glutathione-S-Transferase
H2O2	Peróxido de Hidrogênio
NO2	Nitrito
NO3	Nitrato
ODS	Objetivos do Desenvolvimento Sustentável
OH	Hidróxido
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
POPs	Poluentes orgânicos persistentes
S1	Área de Cultivo (Raposa)
S2	Área de Extrativismo (Paço do Lumiar)
S3	Área Urbana (São José de Ribamar)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	GERAL	19
2.2	ESPECÍFICOS	19
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1	POLUIÇÃO DO AMBIENTE AQUÁTICO	20
3.2	CONTAMINANTE INORGÂNICO NITRITO (NO₂)	21
3.3	OSTRAS COMO BIOINDICADORES DE POLUIÇÃO AQUÁTICA	23
3.3.1	Ostras do gênero <i>Crassostrea</i>	24
3.4	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR EM OSTRAS	26
3.5	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS PARA A QUALIDADE DA ÁGUA	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	29
4.2	ATIVIDADES DE CAMPO	30
4.3	ATIVIDADES DE LABORATÓRIO	31
4.4	QUANTIFICAÇÃO DE NITRITOS	33
4.5	EXTRAÇÃO DE DNA	33
4.6	PCR MULTIPLEX	34
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5	RESULTADOS FINAIS E DISCUSSÃO	37
5.1	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICA DA ÁGUA	37
5.2	BIOMETRIA DAS OSTRAS	39
5.3	QUANTIFICAÇÃO DE NITRITOS (NO₂)	44
5.4	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	49
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
	REFERÊNCIAS	52
	APÊNDICE	61

1 INTRODUÇÃO

Os corpos hídricos, devido ao crescimento populacional acelerado, vêm sofrendo contaminação das suas águas, comprometendo seu uso e as comunidades aquáticas que neles vivem (MANSON, 1996; MARTINEZ *et al.*, 2002; SOUZA, 2021). A qualidade da água dos ecossistemas aquáticos é degradada por poluentes lançados nestes ambientes. Estes podem originar-se de fontes pontuais, tais como esgotos domésticos, efluentes industriais ou fontes dispersas, tais como águas de escoamento superficial e águas de infiltração (MACHADO *et al.*, 2013). No estado do Maranhão, o principal fator de poluição dos rios é o despejo de esgoto doméstico e a disposição inadequada de resíduos sólidos (IMESC, 2009).

O monitoramento dos recursos hídricos, por meio do uso dos parâmetros físicos-químicos da água constitui uma importante ferramenta para monitorar a qualidade da água (SILVA, 2015). No entanto, métodos que possibilitem uma análise mais completa dos efeitos de contaminantes no ambiente fizeram com que novas ferramentas fossem adicionadas ao monitoramento ambiental para melhorar os estudos relacionados ao mesmo (SANTOS, 2019).

Surgem, assim, os biomarcadores, que são definidos como qualquer resposta a um contaminante ambiental ao nível individual, medidos no organismo ou matriz biológica, indicando um desvio do status normal, que não pode ser detectado no organismo intacto. O uso de biomarcadores como ferramenta para avaliação da contaminação dos ambientes aquáticos é considerado um sensível indicador para detectar e quantificar danos provocados por agentes lançados no ambiente aquático (SANTOS, 2018).

Além dos biomarcadores, há outras ferramentas para avaliar o efeitos antrópicos nos ambientes aquáticos, como, a quantificação de espécies iônicas, como o nitrito (NO_2), substância inorgânica presente nos organismos aquáticos e na água, tem se revelado um novo método bioquímico, que pode ser adicionado ao biomonitoramento ambiental. O nitrito é proveniente da chuva ácida e também é utilizado como conservante na indústria alimentícia (OLIVO; RIBEIRO, 2018). Este possui alta relevância em fluidos biológicos, estudos forenses e na segurança alimentar, uma vez que seu consumo excessivo, proveniente de carnes industrializadas, pode ser prejudicial à saúde humana, causando, principalmente, câncer gástrico (BRYAN *et al.*, 2010). Isso ocorre pelo fato de que aminas

secundárias das proteínas podem reagir com o nitrito (NO_2), formando nitrosaminas, no caso de aquecimento e/ou pH ácido, causando toxicidade no organismo (COLT; ARMSTRONG, 1981).

Existe uma escassez de estudos relacionados à avaliação e análise de nitritos em animais aquáticos. Um dos poucos trabalhos encontrados na literatura sobre o estudo dos efeitos dos nitritos em peixes, foi o de Smith e Williams (1974), onde eles constataram a presença e a letalidade desse contaminante inorgânico nos animais. A escassez é ainda maior quando se trata de molusco bivalve, onde até o presente momento a única pesquisa encontrada foi referente aos efeitos do nitrito em *Crassostrea virginica*, realizado por Epifanio e Sarna (1975).

O uso da biota aquática como ferramenta de monitoramento ambiental vem sendo utilizado através de organismos sensíveis a alterações que ocorrem no meio. Dentre os organismos utilizados como bioindicadores, destacam-se as ostras, que são capturadas normalmente em estuários e zonas costeiras, apresentam ampla distribuição geográfica, possuem tempo de vida relativamente longo, normalmente aparecem em grande densidade e são fáceis de coletar, além de constituírem um grupo de grande importância econômica (JESUS; CARVALHO, 2008; SILVA, 2015).

Os moluscos bivalves acumulam grandes quantidades de contaminantes nos seus tecidos. Entretanto, é através do seu hábito alimentar filtrador que esses invertebrados se tornam suscetíveis à incorporação de contaminantes (RIBEIRO, 2016). Dessa forma, os contaminantes tendem a se acumular no tecido dos bivalves, em concentrações maiores que as verificadas na fonte de exposição. Sendo assim, os moluscos bivalves filtradores são animais com alto potencial a serem utilizados como modelo biológico para se estimar a exposição da biota aquática a contaminantes, especialmente onde ocorre a pesca tradicional (NOLETO, 2018).

Muitas famílias do Maranhão sobrevivem da pesca artesanal, porém, essas famílias hoje enfrentam situações difíceis. As políticas públicas empregadas no setor de saneamento básico para a área deixam muito a desejar. Observa-se uma carência significativa nas condições sanitárias de abastecimento de água, coleta de lixo, tratamento e disposição de esgotos (LACERDA, 2021).

Visto isso, o uso de diferentes métodos de avaliação da qualidade ambiental pode fornecer informações mais amplas sobre efeitos dos contaminantes sobre a biota aquática, auxiliando os gestores locais na tomada de decisões que visem à conservação do ambiente e organismos que vivem no local (SILVA, 2015). Diante do acima exposto, a quantificação de nitritos, em conjunto com análise dos parâmetros físico-químicos da água, biometria e identificação molecular foram escolhidos como ferramentas no biomonitoramento de impactos antópicos na Baía de São José, Maranhão.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o impacto ambiental, por meio da quantificação dos nitritos em ostras do gênero *Crassostrea* em três pontos na Baía de São José, Maranhão.

2.2 Específicos

- Avaliar as características físico-químicas da água nos períodos seco e chuvoso;
- Coletar os dados biométricos das ostras e correlacionar com o período sazonal;
- Quantificar o contaminante inorgânico NO_2 no sobrenadante das ostras e na água nos períodos seco e chuvoso;
- Identificar as espécies de ostras por meio de análise molecular.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Poluição do ambiente aquático

O crescimento da população nas últimas décadas, vinculado ao avanço tecnológico e industrial, tem levado a economia global a um aumento do nível de compostos xenobióticos no ecossistema aquático (OLIVEIRA, 2020). Isso tudo vem contribuindo para a redução da qualidade dos diversos ambientes (água, sedimento, ar e solo), comprometendo, assim, a saúde dos seres vivos que habitam nesse ecossistema (LEON, 2020).

As comunidades urbanas e as indústrias, continuamente liberam compostos químicos exógenos ou xenobióticos no ambiente aquático. A partir do século XX, além das cargas orgânicas convencionais, muitos outros poluentes orgânicos, tais como pesticidas organoclorados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (polycyclic aromatic hydrocarbons-PAHs), bifenilas policloradas (polychlorinated biphenyls - PCBs), dioxinas e furanos vêm sendo produzidos e, em parte, liberados no ambiente (SANTOS; FERREIRA, 2019; SILVA, OLIVEIRA, 2020).

No início da década de 1960, a sociedade começou a se preocupar com os efeitos adversos desses compostos químicos e o risco potencial que eles representam para os ecossistemas aquáticos. Em vários países, a produção, comercialização e utilização de muitos compostos, em especial aqueles considerados Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) foram proibidas (BELTRÃO, 2018; FERREIRA, 2019). Entretanto, em muitos países em desenvolvimento os poluentes orgânicos persistentes POPs ainda são utilizados na agricultura, no controle de vetores de doenças, bem como para fins industriais (BELTRÃO, 2018; STAP, 2004).

No Brasil, a mais recente resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento (BRASIL, 2005), proíbe o lançamento dos POPs nos efluentes e determina que, quando apropriado, a qualidade dos ambientes aquáticos poderá ser avaliada por indicadores biológicos, utilizando-se organismos e/ou comunidades aquáticas.

O Estado do Maranhão é detentor de um dos maiores potenciais hídricos do país, possuindo dez bacias hidrográficas e dois sistemas hidrográficos costeiros. Esta grande malha hídrica do Estado vem sofrendo com o despejo de esgoto doméstico,

industrial e pela disposição inadequada de resíduos sólidos (IMESC, 2009; MARANHÃO, 2011).

3.2 Contaminante Inorgânico nitrito (NO₂)

Os nitritos estão entre os aditivos alimentares mais antigos. Eles começaram a ser utilizados há 3.000 a.C, na conservação de carnes e peixes. Esses componentes atuam como conservantes, antioxidantes e agentes de cor e sabor, promovendo estabilidade físico-química e microbiológica aos produtos cárneos curados e maturados (IAMMARINO *et al.*, 2013; KOBAYASHI, 2018). Historicamente, o NO₂ teve contribuição no desenvolvimento de algumas civilizações, que se expandiram comercialmente e ampliaram a relação interna de conhecimento e cultura, graças à ação desse conservante (SINDELAR *et al.*, 2011).

No início da década de 1970, o uso do nitrito tem sido motivo de controvérsia, pois, apesar da sua relevância tecnológica e segurança alimentar, essa substância pode ser prejudicial à saúde humana (SINDELAR *et al.*, 2011). Uma vez que seu consumo causa câncer gástrico. Isso se baseia no fato de que as aminas secundárias das proteínas podem reagir com o nitrito (NO₂), formando nitrosaminas (no caso de aquecimento e/ou pH ácido), compostos potencialmente cancerígenos, capazes de transformar a hemoglobina do sangue em ferri-hemoglobina, processo que leva ao impedimento do transporte do oxigênio dos alvéolos para os tecidos, estabelecendo-se um quadro de hipoxia e cianose (OLIVIO *et al.*, 2018; GOSHI *et al.*, 2019). O nitrito confere ao sangue uma inconfundível cor marrom, indicando a oxidação do pigmento respiratório (BARBIERI *et al.*, 2014; OLIVO, RIBEIRO, 2018; FRATUCCI *et al.*, 2020). Visto isso, no século XX houve registro de casos de metahemoglobinemia infantil, associados a nitritos e nitratos inorgânicos presentes na água (KOBAYASHI, 2018; SINDELAR *et al.*, 2012).

A metahemoglobinemia também é conhecida como síndrome do bebê azul. É causada pela presença de nitrito no sangue, o qual é capaz de oxidar a hemoglobina, que acaba perdendo a capacidade de realizar o transporte do oxigênio aos tecidos, causando anóxia (SINDELAR *et al.*, 2011; IAMMARINO *et al.*, 2013). Essa síndrome pode ocorrer apenas em bebês de até 06 meses de vida, que não possuem ainda o sistema enzimático protetor completamente desenvolvido. Cerca de 10% a 20% de metahemoglobinemia em excesso no sangue é o suficiente para causar

a cianose, e assim provocar a coloração azul-arroxeadada na pele (ARCHER, 2002; RIBEIRO; OLIVO, 2016).

Estudos realizados com o nitrito apontam que a segunda fonte principal desse conservante inorgânico (NO_2) vem do nitrato (NO_3) presente em vegetais. Tubérculos, como alface, beterraba, aipo, espinafre, além de folhas verdes e algumas frutas, contêm altas concentrações de NO_3 (GOSHI *et al.*, 2019; TUSIEWICZ *et al.*, 2023). Uma pequena quantidade desses vegetais já é o suficiente para se obter mais nitrato do que endogenamente produzido pelas formas enzimáticas (BEDALE *et al.*, 2016; MAJOU; CHRISTIEANS, 2018)

A primeira fonte de ingestão do nitrito vem da saliva, onde bactérias comensais que vivem nas criptas da língua reduz quimicamente o nitrato alimentar em nitrito. A terceira fonte é a ingestão de outros alimentos e da água (MAJOU; CHRISTIEANS, 2018). Uma vez que o nitrito está presente na chuva ácida, que reduz o pH dos corpos hídricos e somados ao despejo inadequado de esgoto e o descarte impróprio do lixo podem ter como consequências a contaminação ambiental e a morte de peixes, invertebrados, anfíbios e outros seres vivos (COLT e ARMSTRONG, 1981).

O Nitrito liberado pela queima de combustíveis fósseis, principalmente emissões veiculares e industriais, reage rapidamente com o oxigênio atmosférico formando o ácido nítrico, induzindo a formação da chuva ácida (TUSIEWICZ *et al.*, 2023). Além disso, o nitrito faz parte dos contaminantes provenientes dos produtos farmacêuticos, tanto de aplicações humanas como de usos veterinários, em volumes que são comparáveis a total de cargas dos pesticidas (BRAIN *et al.*, 2008)

A chuva ácida é uma das consequências da poluição atmosférica e ocorre normalmente em países em desenvolvimento. Atualmente, ela está incluída nas 169 metas dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS). Entre as consequências da chuva ácida está a elevada concentração de ácidos, como o dióxido de enxofre, que pode causar a diminuição do pH dos lagos e rios, causando o desequilíbrio das cadeias tróficas, diminuição da biodiversidade e ainda pode causar prejuízos à saúde humana (ONU, 2015).

Dessa forma, os animais com hábito alimentar filtrador, como as ostras, possuem alto potencial de ter grandes concentrações de alguns compostos xenobióticos em seu organismo, uma vez que são organismos sésseis e

bioacumuladores (SANTANA, 2019); os nitritos são um dos compostos que podem estar presentes nos tecidos desses animais. Alterações morfológicas de suas conchas, da espessura da mesma, na relação peso da concha, peso de carne, refletem a qualidade do ambiente onde vivem (SANTANA *et al.*, 2020).

3.3 Ostras como biomonitores de poluição aquática

Bioindicadores são espécies sentinelas que são utilizadas como primeiros sinalizadores dos efeitos da contaminação de seu habitat (AKAISHI, 2003). Os contaminantes podem se manifestar em vários níveis de organização biológica, incluindo disfunções fisiológicas, alterações estruturais em órgãos e tecidos, além de modificações comportamentais, que podem prejudicar o crescimento e a reprodução (ADAMS *et al.*, 1990; LENZ, 2016). Alguns critérios são utilizados para a escolha de organismos bioindicadores, tais como: abundância da espécie, a capacidade de sobreviver em ambientes saudáveis e resistir a ambientes contaminados, assim também como a facilidade de adaptar-se às condições laboratoriais (AKAISHI, 2003).

As ostras são organismos sensíveis a alterações que ocorrem no meio em que vivem, pois são filtradores e estão diretamente expostos aos xenobióticos presentes no ambiente (LEMOS *et al.*, 2007; LENZ, 2016). Dessa forma, são considerados excelentes organismos sentinelas no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. Apesar da dificuldade em se estabelecer ligações diretas entre efeitos ecológicos e a saúde humana, o uso de ostras como sentinelas de problemas ambientais é uma ferramenta adequada para complementar a avaliação da qualidade ambiental (LENZ, 2016; NOLETO, 2018).

Segundo Kaouli (2016), as ostras possuem várias características biológicas quais tornam bons bioindicadores de contaminação em programas de monitoramento ambiental, uma vez que são organismos filtradores, sésseis, cosmopolitas, abundantes e resistentes a variações que ocorrem no ambiente e concentram grandes quantidades de contaminantes, como metais pesados, hidrocarbonetos, pesticidas, entre outros (KAOU LI, 2016). Além disso, as ostras são animais que possuem facilidade de adaptações a diferentes condições ambientais, apontando, logo, grande habilidade em sobreviver em ambientes com grande taxa de poluentes e agentes tóxicos (BENASSI, 2004).

Os programas de monitoramento ambiental, especialmente de recursos hídricos, têm se preocupado com a quantificação de contaminantes presentes na

água e nos organismos de grande importância econômica, como as ostras (LEMOS *et al.*, 2007; LENZ, 2016). Embora esse seja um ponto importante, as análises químicas não fornecem informações dos efeitos tóxicos provocados por tais substâncias (LENZ, 2016; NOLETO, 2018). Adicionalmente, nas áreas impactadas pela ação humana, os moluscos bivalves, além de acumularem contaminantes químicos, podem acumular outros microorganismos nocivos à saúde humana, uma vez que eles são um recurso pesqueiro altamente consumido pela população (NOLETO, 2018).

3.3.1 Ostras do gênero *Crassostrea*

As ostras do gênero *Crassostrea* fazem parte da Classe Bivalvia do filo Mollusca. Elas possuem como característica a presença de uma concha composta por duas valvas que abrangem todo o corpo (RUPPERT; BARNES, 1996). A maioria de espécies de ostras deste gênero são encontradas em regiões costeiras rasas (COUTINHO, 2012).

Uma ostra típica possui as seguintes características anatômicas: Concha, que é formada por carbonato de cálcio e possui três camadas: o perióstraco, óstraco e hipóstraco. O perióstraco é a camada mais externa e geralmente tem cor marrom. O óstraco é a camada mais intermediária e o hipóstraco é a camada mais interna, que é formado por cristais laminares de CaCO_3 e é nesta camada que ocorre a formação da pérola (ABSHER, 2015). Músculo Adutor: responsável pelas junções das duas valvas da concha (COUTINHO, 2012). Brânquias: encarregadas pela respiração do organismo e filtração dos alimentos. Manto: tecido que recobre a parte mole do corpo do animal, exceto o músculo adutor. Ele ajuda na formação da concha e tem funções sensoriais (COUTINHO, 2012; LENZ, 2016). Palpos labiais: incumbido de receber parte do alimento. Estômago: o alimento depois de passar nesse órgão é enviado para os divertículos digestivos e intestino. O material não aproveitado pelo organismo, conhecido como pseudo-fezes é eliminado pelo animal pelas valvas (MOREIRA, 2008). Glândula digestiva: Nelas estão localizadas as enzimas responsáveis em eliminar alimentos contaminados. Já que os organismos bivalves possuem hábito alimentar filtrador, eles acabam concentrando alto índice de contaminantes em seu trato digestório (FROELICH; NOBLE, 2014).

As ostras são invertebrados filtradores e se alimentam principalmente de matéria orgânica e fitoplâncton (FROELICH; NOBLE, 2014). Este hábito alimentar faz

com que as ostras capturem partículas de possíveis contaminantes presentes na água, sejam eles inorgânicos ou orgânicos, uma vez que a taxa de filtração pode chegar a 10 litros/hora/grama de tecido seco (FROELICH; NOBLE, 2014; LENZ, 2016).

O sistema circulatório da *Crassostrea* é aberto. O coração é formado por um ventrículo e duas aurículas, artérias, veias e hemolinfa (COUTINHO, 2012). O sistema nervoso é constituído por um gânglio cefálico, visceral e cordões nervosos (MIOSSEC *et al.*, 2009). Além disso, as ostras possuem o sistema digestivo aberto e possuem uma concha com várias camadas: Periostracum, prismática e a sub-nacarada. A camada mais externa, a periostracum, é mais fina comparada às outras e possui em sua constituição proteínas que se *desgastam* rapidamente. A camada prismática é intermediária e formada por cristais de calcita e a sub-nacarada se trata da parte mais dura e brilhante da concha, esta fica em contato com o corpo mole do animal (RASZL, 2016).

As ostras do gênero *Crassostrea* são ovíparas e hermafroditas protândria, sem dimorfismo sexual (CHRISTO, 2006). O sistema reprodutivo delas é formado pelas gônadas, que produzem e armazenam as células sexuais. Os gametas são liberados para o meio externo pelos gonodutos e, em seguida, acontece o desenvolvimento larval, que é caracterizado por três estágios: Larva D, Umbo e Pedivéliger. A maioria das ostras juvenis alcança a maturidade sexual antes dos 30mm, logo após 120 dias da fixação, aproximadamente (CHRISTO, 2006; MIOSSEC *et al.*, 2009; RASZL, 2016).

Quanto as brânquias, elas são responsáveis pela filtração do alimento e respiração. Este órgão é constituído por filamentos, e as partículas capturadas são conduzidas aos palpos labiais e posteriormente à boca (MORATELLI JUNIOR, 2003). Desta forma, estudos realizados com ostras do gênero *Crassostrea* apontam que elas são bioindicadores eficazes em programas de monitoramento ambiental (NOLETO *et al.*, 2021).

A identificação taxonômica das ostras é alvo de várias divergências entre os autores, uma vez que são organismos difíceis de diferenciar. Em vista disso, a técnica de identificação molecular tem se tornado a mais indicada para identificar ostras do gênero *Crassostrea*, pois se trata de um método sensível e preciso. Além de se tratar de uma metodologia eficiente no monitoramento da distribuição das espécies de ostras, bem como uma ferramenta acessível à aquicultura (LOPES *et al.*, 2018).

3.4 Identificação molecular em ostras

No Brasil existem duas espécies de ostras nativas, a *Crassostrea gasar* e a *Crassostrea rhizophorae*, e uma espécie exótica, que veio do Japão ou do Pacífico, a *Crassostrea gigas* (IGNACIO *et al.*, 2000). Esta última é mais encontrada nos cultivos do sul do país, pois se desenvolvem melhor em clima frio. No norte e nordeste do Brasil, as ostras nativas são normalmente cultivadas ou extraídas pelas comunidades pesqueiras (ALMEIDA, 2014; ESCAPA *et al.*, 2004; IGNACIO *et al.*, 2000).

O monitoramento de diferentes espécies de ostras em habitats naturais não é um trabalho simples, pois a diferenciação não pode ser feita apenas morfologicamente (LOPES *et al.*, 2018). Características como cor da concha, estrutura e forma são altamente influenciadas pelo ambiente em que vivem, causando, assim, grandes dificuldades na identificação de espécies (LAPÉGUE *et al.*, 2002). Dessa forma, a inserção da biologia molecular na sistemática de ostras trouxe novas ferramentas capazes de identificar as espécies de ostras em estudos e pesquisas de monitoramento ambiental, bem como sua distribuição geográfica (PIE *et al.*, 2006; LAPÉGUE *et al.*, 2002).

A classificação taxonômica das ostras nativas do Brasil é motivo de divergência entre alguns autores na literatura. Segundo Lapégue *et al.*, (2002) há três espécies de *Crassostrea*: a *Crassostrea gasar*, *Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea gigas*. Já para Singarajah (1980) e Rios (1994), apenas a *Crassostrea gasar* era considerada como nativa, a *Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea gigas* eram consideradas sinônimas. Entretanto, Ignacio *et al.*, (2000) foi um dos primeiros a usar técnicas de identificação molecular em ostras e apresentou evidências que indicavam diferenciação nas espécies ditas sinônimas: a *Crassostrea rhizophorae* e *Crassostreagigas*.

Apesar do desenvolvimento das técnicas de identificação molecular de ostras do gênero *Crassostrea* nos últimos anos, poucos trabalhos foram realizados visando à prevalência de diferentes espécies na Baía de São José.

3.5 Parâmetros físico-químicos para a qualidade da água

A qualidade de água está relacionada ao tipo de uso e envolve a avaliação das suas condições físicas, químicas e biológicas, relacionando-se à sua potencialidade (GONÇALVES, 2005). O CONAMA, Conselho Nacional do Meio

Ambiente, é o órgão oficial responsável pelo estabelecimento de normas e padrões relativos ao controle de qualidade do meio ambiente com vistas ao uso racional dos recursos ambientais, principalmente hídricos. Suas resoluções são importantes instrumentos normativos para a gestão ambiental em busca do crescimento sustentável (BRASIL, 2005).

O acompanhamento das variáveis físico-químicas visa compreender as variações naturais destas no ambiente e os efeitos provocados por diversas fontes de poluentes sobre as mesmas (GOMES, 2019). Diversos parâmetros físico-químicos são utilizados para analisar a qualidade da água, destacando-se o oxigênio dissolvido, pH, temperatura, turbidez, fósforo, condutividade e salinidade (FARIAS, 2006). Conhecer estes parâmetros é importante para avaliar e identificar alterações causadas na água, sejam elas de origem natural ou antropogênica (BRASIL, 2005). Nesse sentido, foi realizado um breve levantamento dos principais parâmetros físico-químicos e suas características, assim como seu significado ambiental na avaliação da qualidade da água.

O Oxigênio Dissolvido é um indicador ecológico característicos de duas fontes: atmosfera e fotossíntese (FARIAS, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2020). Esse parâmetro expressa a quantidade de oxigênio dissolvido no meio, sendo sua concentração influenciada por variações sazonais fotossintéticas, como também pela vazão do rio. A presença de sólidos em suspensão e de substâncias orgânicas biodegradáveis, tais como esgoto doméstico e industrial afeta sua concentração no meio (BUENO, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2020).

A temperatura interfere na maioria dos processos físicos, químicos e biológicos do sistema aquático (MIRANDA *et al.*, 2009). Essa variável está diretamente relacionada ao metabolismo dos seres vivos e com os processos de decomposição da matéria orgânica (ESTEVES, 1998; FARIAS, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2020).

O potencial hidrogeniônico (pH) tem efeitos sobre a fisiologia dos organismos, pois está relacionado à precipitação e à solubilidade de nutrientes (CAMARGO *et al.*, 2019). É uma variável usada para expressar a intensidade da condição ácida ou básica de uma solução, agindo diretamente na permeabilidade das membranas dos seres vivos (SANTOS, 2018).

A turbidez expressa o grau de penetração da luz na água, sendo resultante do processo natural de erosão, do escoamento superficial e dos detritos orgânicos

diluídos e suspensos na água (GASPAROTTO, 2011). Esta variável influencia diretamente sobre o processo de fotossíntese e, conseqüentemente, sobre as concentrações de oxigênio dissolvido no ambiente (NASCIMENTO *et al.*, 2020).

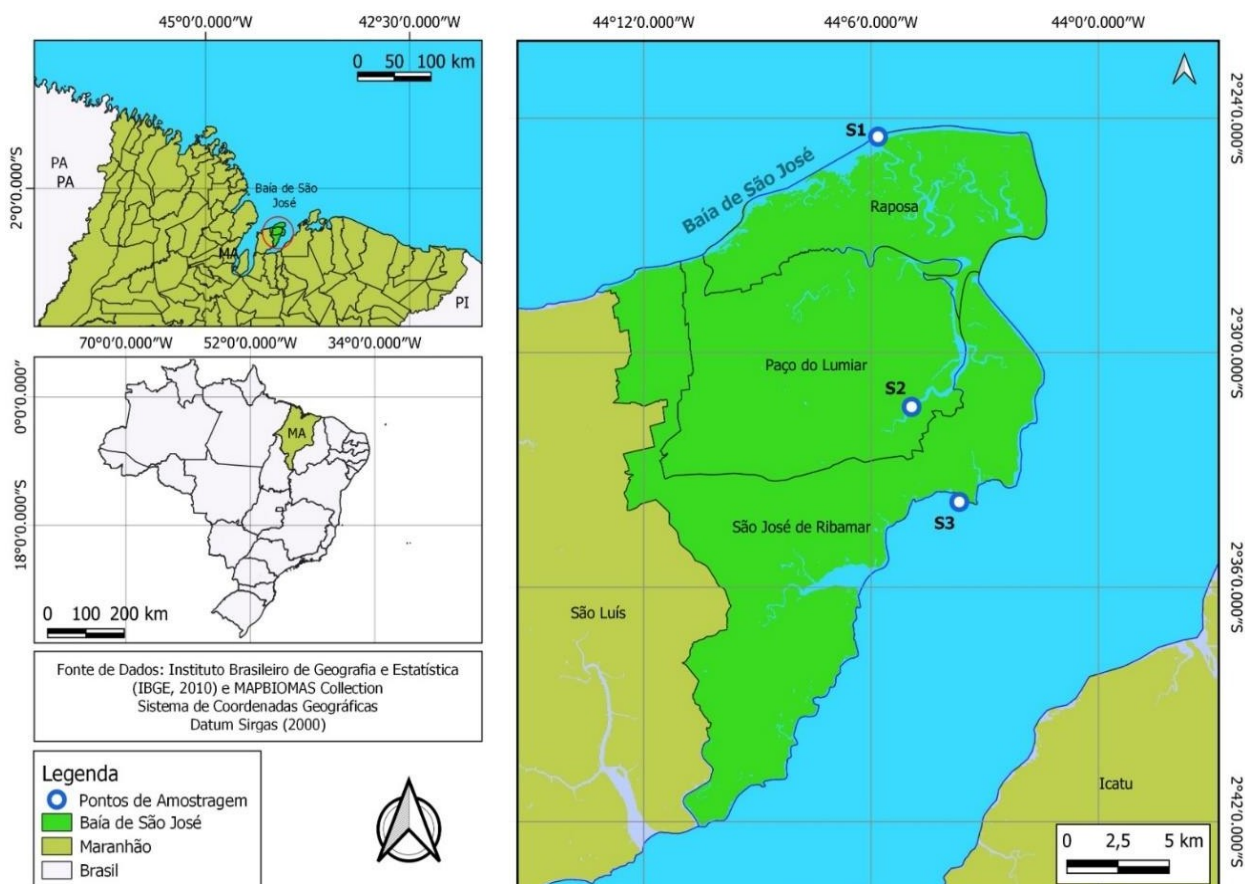
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da área de estudo

O Maranhão possui o segundo maior litoral do Brasil, perdendo apenas para a Bahia. O estado possui 640 Km de costa, com várias comunidades pesqueiras estabelecidas. Dentre elas, destacam-se as que ficam localizadas na Baía de São José, no litoral norte da ilha de São Luís, abrangendo os municípios de São José de Ribamar, Paço do Lumiar e Raposa (ANDRADE, 2016).

Para atingir os objetivos propostos, foram escolhidos três pontos de coleta na Baía de São José, Maranhão: S1) Cultivo de ostras, localizado no município de Raposa; S2) Área de extrativismo, localizada na comunidade Pau Deitado no município de Paço do Lumiar; S3) Área urbana, localizada no cais do município de São José de Ribamar, como mostra a figura 1.

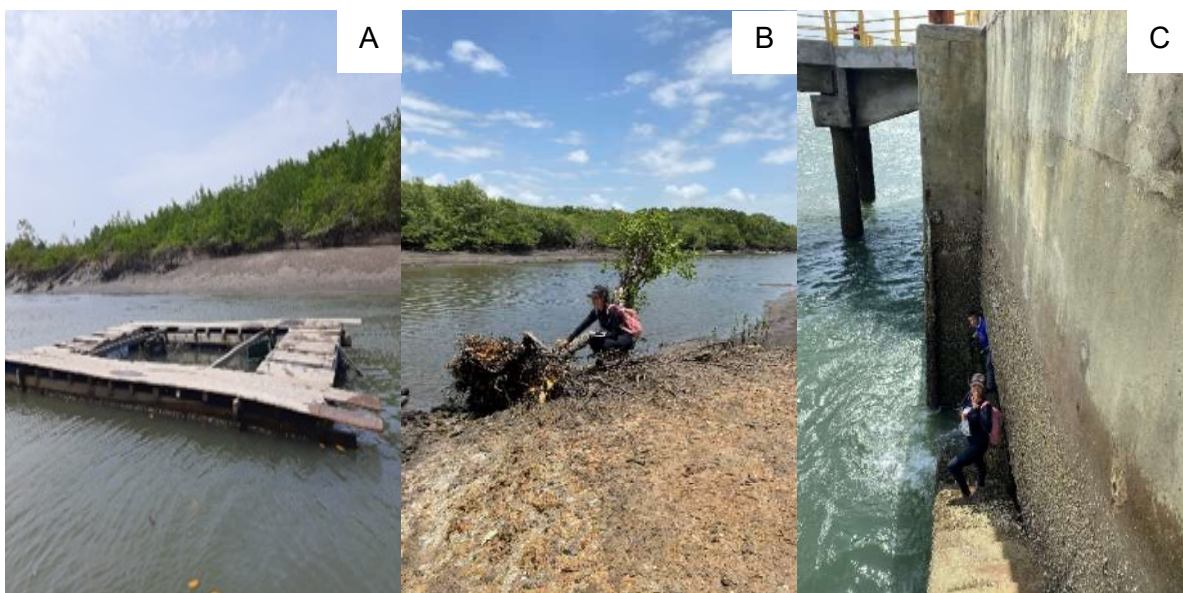
Figura 1 - Mapa com a localização geográfica da Baía de São José, Maranhão, indicando os três locais de coleta de ostras: S1) Ponto de cultivo (município de Raposa); S2) Ponto de extrativismo (município de Paço do Lumiar); S3) Ponto de área urbana (São José de Ribamar).



FONTE: Autor (2023).

Na Área de cultivo, as ostras são para comercialização em toda a grande ilha, já nas áreas de Extrativismo e Urbana, as ostras são utilizadas para consumo próprio, como mostra a figura 2. A Baía de São José possui uma grande importância para a pesca maranhense, pois nessa região existem vários portos de desembarque e venda de pescado, e grande parte da comunidade sobrevive da venda de ostras do gênero *Crassostrea*. Dessa forma, programas de biomonitoramento nessa baía maranhense seriam de grande importância, visto que ela vem sofrendo com os impactos ambientais e ainda não possui um sistema de biomonitoramento de suas águas (ALMEIDA, 2006).

Figura 2 - Locais de coleta, em A) Área 1, Cultivo- Raposa (MA), em B), Área 2, Extrativismo- Paço do Lumiar (MA) e em C), Área 3, São José de Ribamar (MA).



FONTE: Autor (2023).

4.2 Atividades de campo

Foram realizadas duas coletas, sendo uma no período de estiagem (outubro de 2022) e uma no período chuvoso (março de 2023). Em cada ponto foram coletadas 20 ostras por catação manual livre durante a maré de baixa-mar. Logo após a coleta, os indivíduos foram crionestesiados em gelo (0°C), de maneira que se minimizasse o estresse nos animais e se preservassem as características metabólicas dos mesmos. Durante a coleta, foram priorizados os animais maiores (figura 3). No momento de cada coleta (maré baixa), foram registrados os parâmetros físico-químicos da água com o multiparâmetro modelo HANNA em todos os pontos de amostragem, como salinidade, pH, oxigênio dissolvido, condutividade e

temperatura da água. Foi coletado também 2ml de água do mar nos três pontos de amostragens para a quantificação de NO₂.

Figura 3 - Ostra do gênero *Crassostrea sp* coletada na Baía de São José, Maranhão.

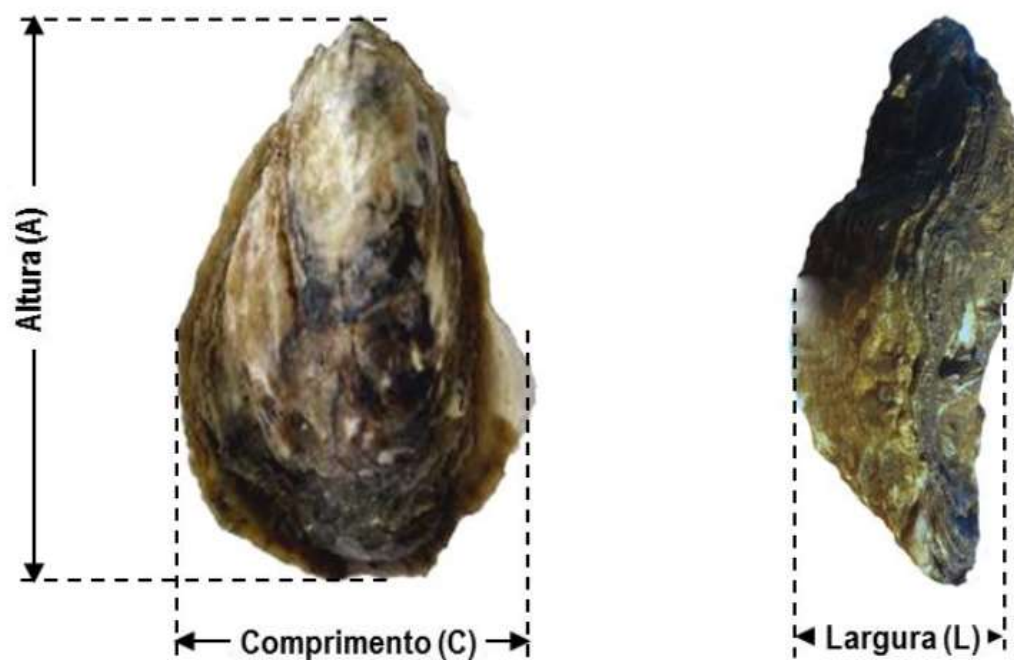


FONTE: Autor (2023).

4.3 Atividades de laboratório

Em laboratório, no mesmo dia da coleta, os animais foram mensurados com um paquímetro (0,01 mm), sendo as dimensões analisadas: a maior largura das valvas em vista frontal, comprimento e altura das valvas (figura 4). Os animais foram também pesados em balança semi-analítica (0,01g). Inicialmente se mediu o peso total dos organismos. Logo depois foi retirado uma parte do tecido (figura 5) e imediatamente acondicionado em tubos tipo eppendorf e colocados em álcool absoluto para armazenamento em freezer no Laboratório de Biodiversidade Molecular- LaBiMol até o momento das análises moleculares. Todas as amostras foram tombadas na CoFauMA – Coleção de tecidos e DNA da fauna maranhense da Universidade Estadual do Maranhão.

Figura 4 – Esquema de medição biométrica das ostras do gênero *Crassostrea* sp.



FONTE: Santana (2019).

Figura 5 - Retirada de tecido de ostras coletadas na Baía de São José.



FONTE: Autor (2023).

Ao todo foram coletadas 120 amostras de ostras de todos os pontos selecionados na Baía de São José, Maranhão (tabela 1).

Tabela 1 – Número de amostras de ostras obtidas por ponto de coleta na Baía de São José no período de Outubro de 2022 e Março de 2023.

Localidade	Nº de Indivíduo	Georeferência	
		S	W
S1	40	02° 25' 22"	44° 05' 21"
S2	40	02° 31' 818"	044° 05' 080"
S3	40	2° 33' 58. 911"	44° 3' 23. 519"
Total	120		

S1: Cultivo de ostras, Raposa-MA; S2: Extrativismo, Paço do Lumiar-MA; S3:Área Urbana, São José de Ribamar-MA.

4.4 Quantificação de Nitritos (Curva 1.3.23 mg/L)

Em laboratório, o sobrenadante das ostras foi retirado, alicotado e acondicionado em tubos do tipo eppendorf, com auxílio de pipeta automática (figura 6). O nitrito presente no sobrenadante foi analisado indiretamente através da reação de Griess que quantifica os nitritos, com base na metodologia descrita por GREEN *et al.* (1982). Esta reação forma um cromóforo durante a reação dos nitritos com a sulfanilamida e com o N (- 1-naftil) etilenodiamina, formando um composto de coloração rosa, que foi quantificado em espectrofotômetro.

Figura 6 - Retirada do sobrenadante das ostras coletadas na Baía de São José, MA.

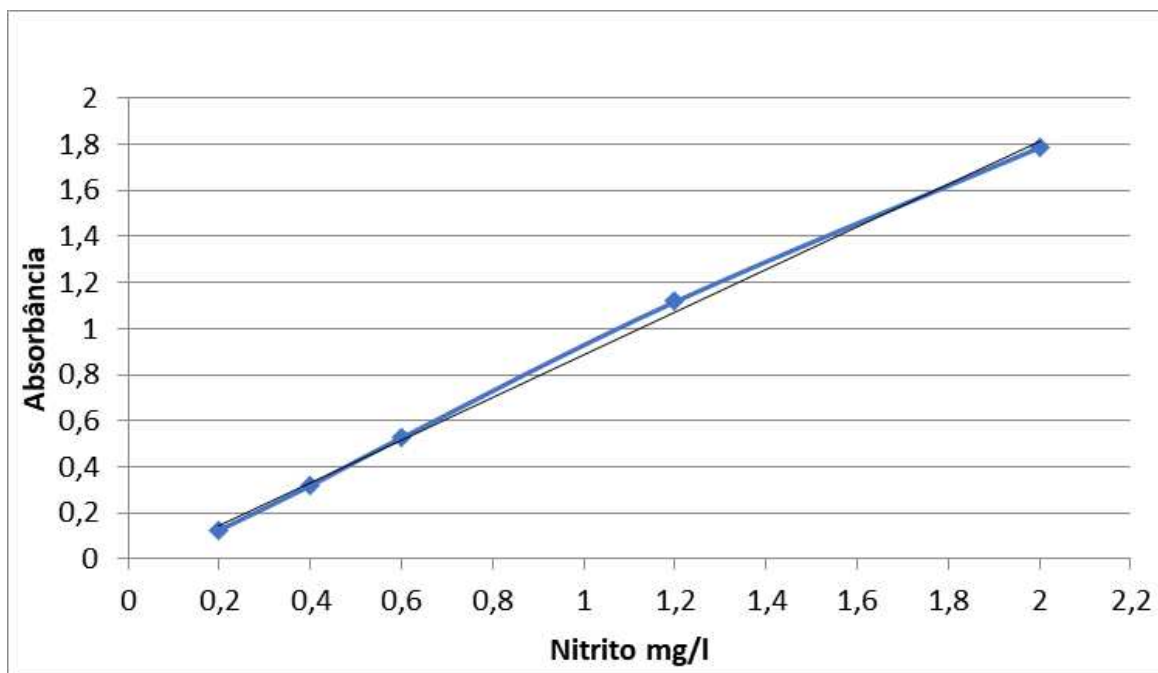


FONTE: Autor (2023).

As amostras do sobrenadante das ostras (500µl) foram descongeladas e centrifugadas a 3.000rpm por 20 minutos em centrífuga refrigerada (Excelsa 4. Mod. 280R - FANEM). Posteriormente, 250µl do sobrenadante foram transferidos para cubetas de plástico e adicionaram-se 250µl do reagente de Griess. As amostras foram colocadas em local escuro à temperatura ambiente, durante 10 minutos para o desenvolvimento da cor e a absorbância foi determinada por espectrofotometria (AJMICRONAL-AJX-1000) em comprimento de onda de 540nm. Todas as amostras foram testadas em duplicado ou triplicado.

A concentração dos nitritos foi determinada por comparação com uma curva de calibração, utilizando uma solução padrão de nitrito de sódio em uma gama de concentrações de 0,2 a 2 mg.L. A Figura 7 demonstra o gráfico da curva de calibração obtida por regressão linear.

Figura 7 - Curva de calibração obtida por regressão linear. Equação da reta ($y=0,9292x-0,0438$. R^2 0,9981).



FONTE: Autor (2023).

4.5 Extração de DNA

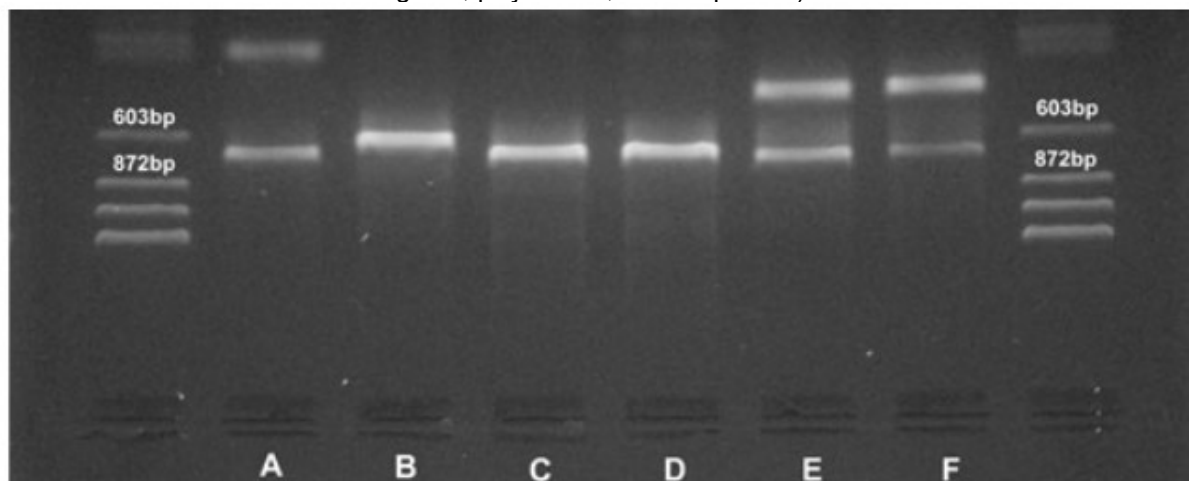
O DNA total foi isolado a partir de tecido muscular, utilizando-se o protocolo salino padronizado por Medrano (1990). Este protocolo consiste nas seguintes etapas:

- Adicionou-se 20 mg de tecido muscular em um microtubo de 1,5 mL;
- O tecido foi lavado duas vezes com 60 mL de água destilada;
- Adicionou-se 550 mL de tampão de lise e 11mL de proteinase K;
- As amostras foram incubadas overnight a 37 °C;
- Adicionou-se 350 mL de NaCl 5M;
- As amostras foram centrifugadas por 30 min a 13.000 rpm;
- Dividiu-se o sobrenadante em duas alíquotas de 375mL;
- Adicionou-se 900 mL de etanol absoluto gelado em cada amostra;
- As amostras foram incubadas a -20 °C durante duas horas;
- Centrifugou-se por 30 minutos a 13.000 rpm; O DNA total foi isolado a partir de tecido muscular, utilizando-se o protocolo;
- Foi descartado o sobrenadante de todas as amostras;
- O pellet foi lavado com 1mL de etanol 70%;
- As amostras foram novamente centrifugadas, agora à 6000 rpm por 5 minutos;
- O material foi levado a estufa a 37 °C para secagem total;
- No final foi adicionado 50 mL de TE 1x em cada tubo;
- O material foi incubado por 3 horas a 37 °C e posteriormente armazenado no freezer.

4.6 PCR multiplex

Para identificação das espécies foi realizado um PCR multiplex como descrito por Melo *et al.*, (2013). Com esta técnica é possível identificar e diferenciar três espécies de ostras do gênero *Crassostrea* (*C. Gasar*, *C. Rhizophorae* e *C. Gigas*), utilizando duas regiões do DNA (CO1 e ITS1) para a diferenciação dos exemplares analisados. O padrão de bandas geradas que caracteriza cada espécie está demonstrado na figura 8.

Figura 8 - Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio mostrando as ampliações gerada pelo PCR Multiplex (poço A, *Crassostrea gigas*; poço B, *Crassostrea* sp. Canela; poço C e D, *C. gasar*; poço E e F, *C. rhizophorae*).



FONTE: Melo (2013).

O programa usado consistiu nos ciclos de temperatura de 94°C por três minutos, 40 ciclos de 94°C por um minuto, 72°C por dois minutos e uma extensão adicional de sete minutos à 72°C.

Os resultados da PCR foram visualizados em uma corrida de eletroforese horizontal a 100Mv em 30 minutos utilizando o gel de agarose 1,5% corado com gel red.

4.7 Análise Estatística

Para a análise paramétrica, foram testados os pressupostos de normalidade (teste de Shapiro Wilks) e homocedasticidade (teste de Levene). Em seguida, para análise estatística foi utilizado o teste Statistic® para verificar as diferenças significativas entre locais de coleta e os períodos climáticos, sendo considerados significativos quando o valor de $p < 0.05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises físico-química da água

Os resultados dos dados abióticos estão dispostos na tabela 2. Dos parâmetros, a temperatura em todas as coletas das três áreas está dentro dos valores estabelecidos pela Resolução CONAMA N° 357/2005 (BRASIL, 2005), exceto na área S2 no período chuvoso, que está abaixo do recomendado.

Tabela 2 - Dados abióticos registrados em três pontos da Baía de São José-MA, no período de estiagem e chuvoso.

Parâmetros	Estiagem (Outubro/2022)			Chuvoso (Março/2023)			Valores recomendados
	S1	S2	S3	S1	S2	S3	CONAMA N°357
Temperatura (°C)	29,3	29,7	27,6	29,9	27,1	28,4	28 - 32°C
pH	7,81	7,33	8,04	7,34	6,93	7,22	6,5 - 8,0
O2 dissolvido (mg/L)	5,3	4,8	5,1	4,2	4,1	4,6	>5 mg/L
Salinidade (g.kg ⁻¹)	36,7	16,7	18,2	28,2	16,1	16,2	>30%

S1: Cultivo de ostras, Raposa-MA; S2: Extrativismo, Paço do Lumiar-MA; S3:Área Urbana, São José de Ribamar-MA.

Segundo Nogueira, Costa e Pereira (2015), a temperatura da água pode ser influenciada pela temperatura do ar, implicando diretamente nas variações da água com menor intensidade, uma vez que durante esse período de estiagem as temperaturas tendem a ser mais quentes. A temperatura superficial é influenciada por fatores, tais como latitude, altitude, estação do ano, período do dia, vazão e profundidade. A temperatura pode ainda influenciar as atividades fisiológicas de animais que vivem no local, como a respiração, reprodução e digestão (REBOUÇAS *et al.*, 2014).

O padrão de altas temperaturas pode ser explicado pelo fato de que o Maranhão está localizado próximo à linha do Equador, fazendo com que a região se apresente quente durante todo o ano, não apresentando variações térmicas evidentes, mesmo com a ocorrência das chuvas (GOMES, 2019). A menor temperatura no período chuvoso é fruto da maior quantidade de água da chuva que diminui levemente as temperaturas nos corpos d'água.

A temperatura do ponto S2 no período chuvoso está abaixo dos valores estabelecidos pela Resolução do CONAMA N° 357/2005 (BRASIL, 2005) (tabela 2). Estudos mostram que a temperatura adequada para o ambiente aquático é importante, pois a mesma pode influenciar no desenvolvimento dos organismos que vivem no local quando à sua morfologia, fisiologia e ecologia, podendo trazer prejuízos futuros aos seres humanos (NASCIMENTO *et al.*, 2020). A temperatura, o oxigênio dissolvido e o efeito da contaminação são fatores intimamente relacionados no ambiente aquático, já que com o aumento de temperatura há aumento da taxa metabólica dos organismos, acarretando maiores gastos energéticos, consumo de oxigênio e, conseqüentemente, maior sensibilidade aos efeitos dos poluentes (GOMES, 2019).

Em relação ao parâmetro pH, as médias variaram entre 6,93 a 8,04, estando em conformidade com a Resolução do CONAMA N° 357/2005 (BRASIL, 2005), como indica a Tabela 2. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Silva *et al.*, (2020), em que o pH das amostras de água de cultivo de ostras no estuário amazônico do estado do Pará, variou entre 6,7 e 7,2.

O pH é um fator de extrema importância para o ambiente aquático, pois influencia as reações e fenômenos químicos que acontecem na água (OSTRENSKY; BOEGER, 1998). Quando o pH é mais alcalino, ocorre uma maior perda de nitrogênio para o meio (SIPAÚBA-TAVARES, 1994), pois há uma maior transformação do íon amônio (NH_4) em amônia livre e gasosa (NH_3), o que pode influenciar no desenvolvimento da biota aquática. A variação nesse parâmetro pode causar grandes alterações nos ecossistemas marinhos, principalmente a espécies sensíveis como os poliquetas. Uma vez que as taxas estejam elevadas, pode afetar a disponibilidade de alimentos e nutrientes dos táxons (SILVA; OLIVEIRA, 2020).

Observamos que nos pontos amostrados as concentrações de oxigênio dissolvido se encontram abaixo dos níveis permitidos pela legislação vigente. Apenas o ponto S1 (área de cultivo) e a área Urbana (S3) no período seco que estão dentro dos valores aceitáveis. Os baixos valores de oxigênio dissolvido nas áreas estudadas indicam presença de matéria orgânica no ambiente, possivelmente proveniente de esgotos domésticos não tratados, além de descarte inadequado de resíduos sólidos no local.

O oxigênio dissolvido é um dos parâmetros mais importantes para expressar a qualidade da água de um determinado ambiente aquático (BRASIL, 2006), sendo

considerado um elemento vital à vida dos peixes, moluscos, plâncton, bactérias e plantas aquáticas (OSTRENSKY; BOEGER, 1998; SIPAÚBA-TAVARES, 1994). A solubilidade do oxigênio na água depende de distintos fatores ambientais, como a temperatura, pressão atmosférica e salinidade (NASCIMENTO *et al.*, 2020).

Nesta pesquisa, o parâmetro de salinidade variou entre 16,1 g.Kg⁻¹ e 36,7 g.Kg⁻¹, sendo maior no período de estiagem, que pode estar relacionada ao processo de evaporação que faz com que aumentem as concentrações de sal nos corpos de água salgados e com baixa renovação. Estudo realizado por Gomes (2019) refere que esta configuração apresenta um cenário típico de ambiente marinho regido pela distribuição pluvial, em que os menores valores são observados no período chuvoso, com precipitação alta. Salinidades inferiores próximas aos níveis de tolerância fazem cessar a alimentação, e a alta concentração de algas pode fazer decrescer ou inibir o estímulo à filtração.

De acordo com o Sistema de Veneza para a salinidade, os ambientes são classificados da seguinte forma: Ambientes aquáticos em água doce (salinidade abaixo de 0,5); Oligoalino (de 0,5 a valores menores que 5,0); Mesoalino (de 5,0 a menores que 18,0); Polialino (de 18,0 a menores que 30,0) e Eualino (salinidade de 30 a 40,0) (VENICE-SYSTEM, 1959).

Dessa forma, no período deste estudo a salinidade manteve características mesoalinas, polialinas e eulialinas, o que é apresentado pela maioria das águas estuarinas das regiões tropicais. Tal parâmetro pode estar sendo influenciado pela pluviosidade e aporte fluvial, que gradativamente diluem as águas salinas dentro do sistema estuarino (NASCIMENTO *et al.*, 2020).

5.2 Biometria das ostras

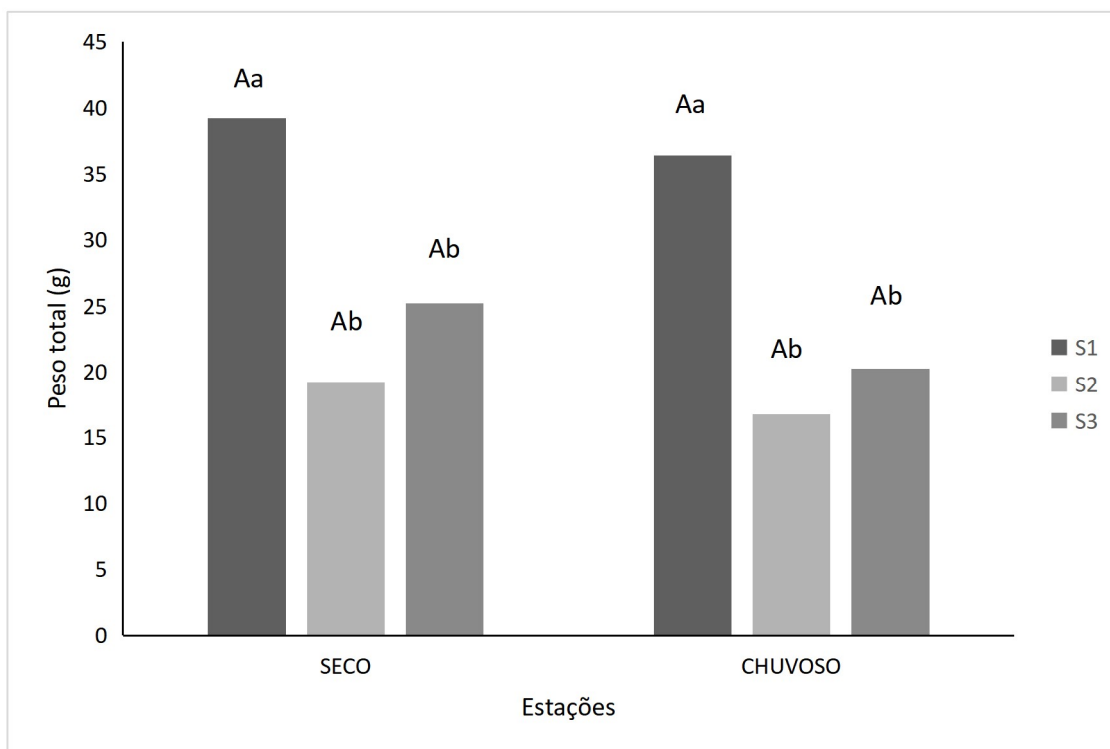
Os dados biométricos das ostras coletadas no período de outubro de 2022 e março de 2023 estão indicados nas figuras 9, 10, 11 e 12. Esses resultados mostram que o peso total, altura, comprimento e largura dos organismos coletados no ponto S1 apresentaram valores significativamente maiores no período de estiagem e chuvoso comparados ao ponto de extrativismo (S2) e área urbana (S3).

As ostras da área S2 apresentaram os menores valores em todas as dimensões analisadas, quando comparados com os pontos S1 e S3, exceto em comprimento no período seco.

O peso total das ostras no ponto S1 variou entre 39,20 g ± 12,53 e 36,4 g ±

13,4, no S2 de $19,25 \text{ g} \pm 6,7$ a $16,75 \text{ g} \pm 5,24$ e no ponto S3 de $25,22 \pm 7,5$ a $20,26 \pm 3,7$. Verificou-se que as ostras no período seco são mais pesadas e consequentemente acumulam mais sobrenadante. Estatisticamente não houve diferença significativa no peso das ostras dos 3 pontos entre os dois períodos sazonais (seco e chuvoso). Mas, ao comparar o peso no mesmo período, as ostras coletadas no ponto S1 foram mais pesadas do que as ostras dos pontos S2 e S3, tanto no período seco ($p=0,00012$) quanto no chuvoso ($p=0,00012$). Ao comparar as ostras dos pontos S2 e S3, verificou-se que não houve diferença significativa em ambos os períodos sazonais, como mostra a figura 9.

Figura 9 - Média do peso total das ostras coletadas na Baía de São José no período seco (outubro de 2022) e chuvoso (março de 2023): S1) Área de cultivo (município de Raposa); S2) Área de extrativismo (município de Paço do Lumiar); S3) Área urbana (São José de Ribamar). A e B diferenças estatísticas do ponto entre as estações. a e b diferença estatística entre os pontos na mesma estação.

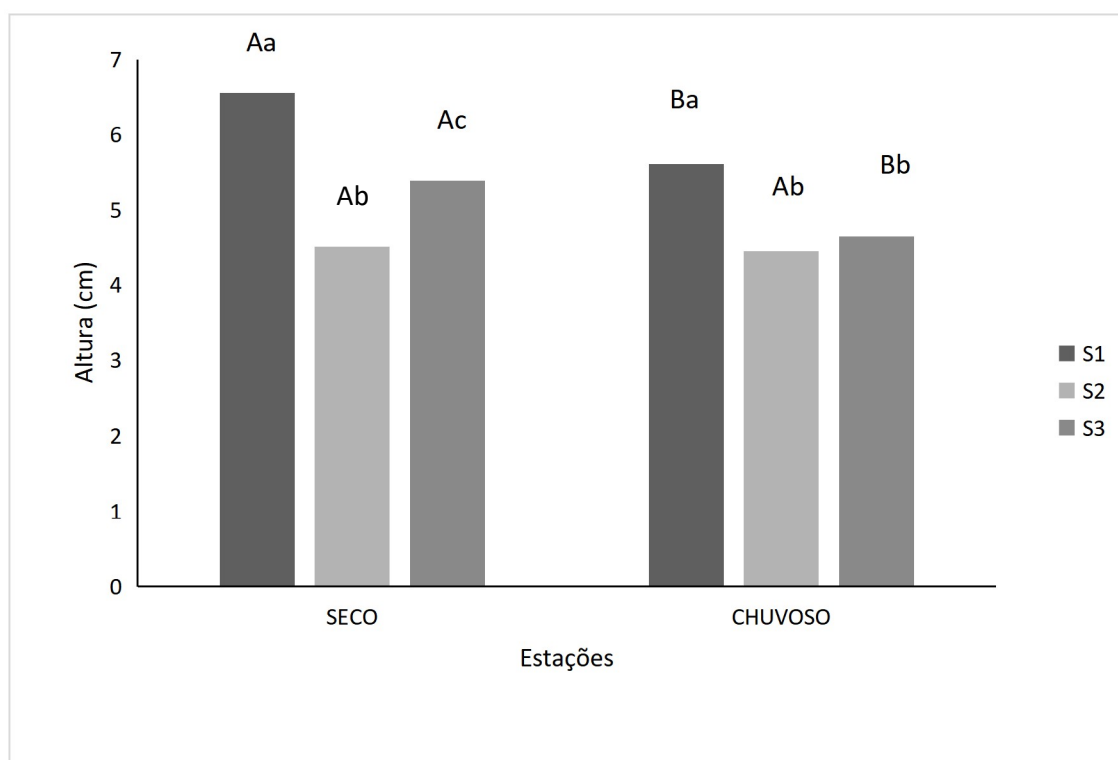


FONTE: Autor (2023).

As ostras apresentaram alturas variáveis ao longo das três áreas de coleta (figura 10). A altura das ostras do ponto S1 variou entre $6,55 \pm 0,7$ e $5,61 \pm 1$ cm, no ponto S2 entre $4,52 \pm 0,8$ e $4,45 \pm 0,6$ cm e no ponto S3 entre $5,39 \pm 0,7$ e $4,65 \pm 0,4$

cm. Houve diferenças significativas nos pontos S1 e S3 entre os diferentes períodos ($p=0,00199$ e $p=0,03652$ respectivamente), sendo as ostras com maior altura no período seco. Também foi observado diferença significativa entre todos os pontos no período seco, sendo as ostras de S1 mais altas (entre S1 e S2 $p=0,000119$, entre S1 e S3 $p=0,000223$ e entre S2 e S3 $p=0,007561$). Já no período chuvoso, a altura das ostras de S2 e S3 foram semelhantes estatisticamente (figura 10).

Figura 10 - Média da altura das ostras coletadas na Baía de São José no período seco (outubro de 2022) e chuvoso (março de 2023): S1) Área de cultivo (município de Raposa); S2) Área de extrativismo (município de Paço do Lumiar); S3) Área urbana (São José de Ribamar). A e B diferenças estatísticas do ponto entre as estações. a, b e c diferença estatística entre os pontos na mesma estação.

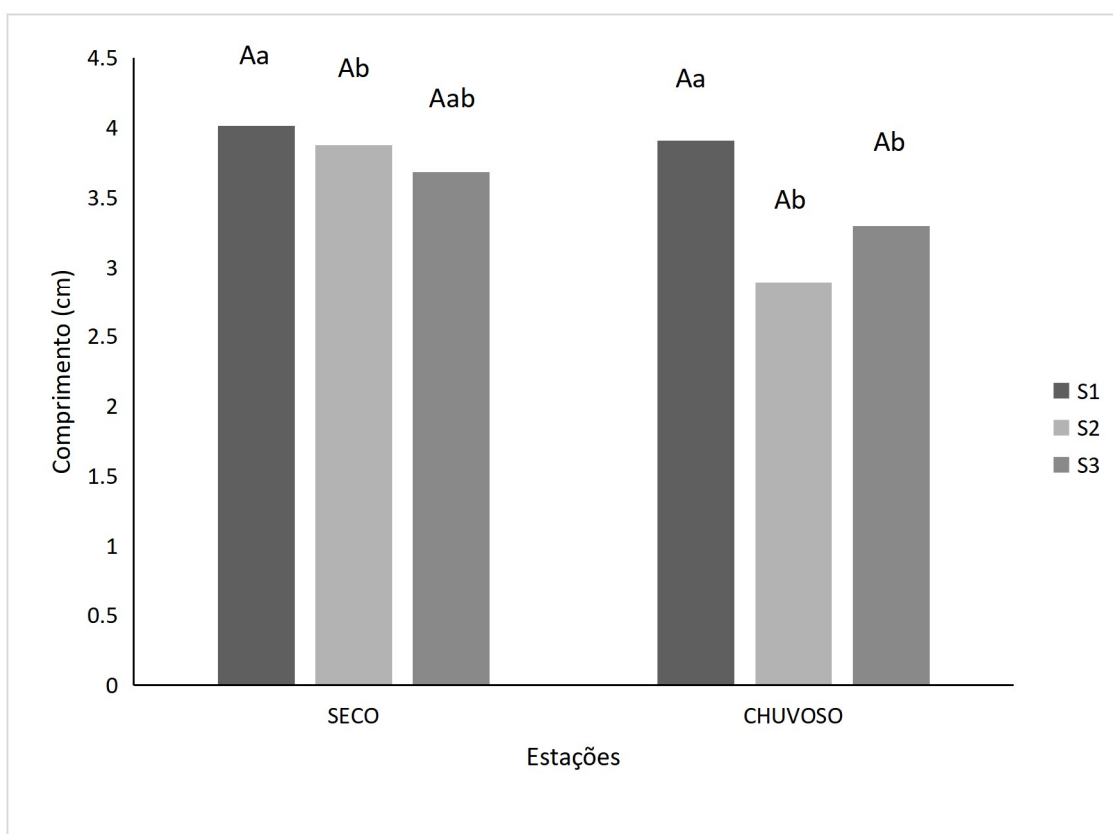


FONTE: Autor (2023).

O comprimento das ostras no ponto S1 variaram entre $4,015 \pm 0,6$ e $3,91 \pm 0,8$ cm, no ponto S2 entre $3,87 \pm 2,1$ e $2,89 \pm 0,6$ cm e no ponto S3 entre $3,68 \pm 0,5$ e $3,29 \pm 0,3$ cm. No período seco as ostras com maiores dimensões de comprimento foram do ponto S1, seguido do S2 e por último S3, neste mesmo período houve diferença significativa entre os pontos S1 e S2 ($p=0,035$). No período chuvoso, as ostras de S2 e S3 apresentaram dimensões de comprimento estatisticamente semelhantes. As ostras do ponto S1 tiveram maior comprimento em relação as ostras de S2 ($p=0,00013$) e S3 ($p=0,024874$) (figura 11).

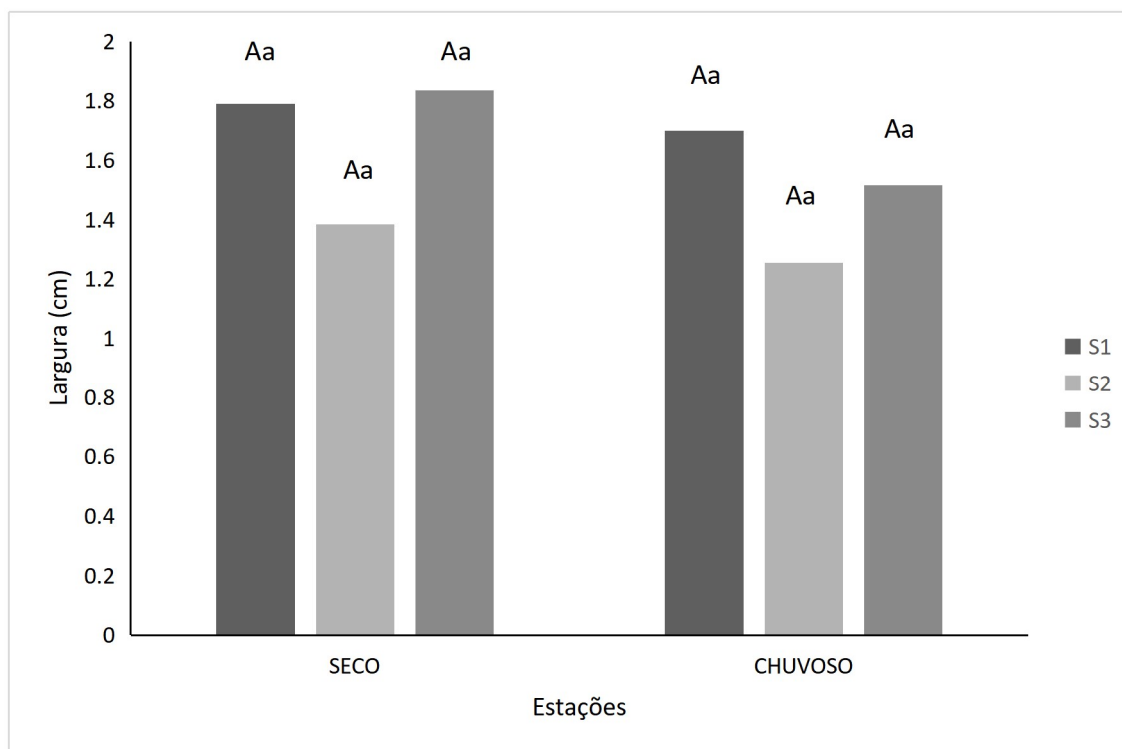
Os valores de largura das ostras analisadas estão dispostos na figura 12. Onde os valores do ponto S1 variaram respectivamente entre $1,79 \pm 0,4$ e $1,7 \pm 0,7$ cm. Na área S2, essa variação foi de $1,38 \pm 0,3$ e $1,25 \pm 0,3$ cm. Já na área S3 os valores de largura das ostras foram entre $1,83 \pm 0,8$ e $1,51 \pm 0,3$ cm (figura 3). Não foram encontradas diferenças estatísticas na largura das ostras entre os 3 pontos no mesmo período, nem entre os pontos nos períodos sazonais (seco e chuvoso).

Figura 11 - Média do comprimento das ostras coletadas na Baía de São José no período seco (outubro de 2022) e chuvoso (março de 2023): S1) Área de cultivo (município de Raposa); S2) Área de extrativismo (município de Paço do Lumiar); S3) Área urbana (São José de Ribamar). A e B diferenças estatísticas do ponto entre as estações. a e b diferença estatística entre os pontos na mesma estação.



FONTE: Autor (2023).

Figura 12 - Média da largura das ostras coletadas na Baía de São José no período seco (outubro de 2022) e chuvoso (março de 2023): S1) Área de cultivo (município de Raposa); S2) Área de extrativismo (município de Paço do Lumiar); S3) Área urbana (São José de Ribamar). A e B diferenças estatísticas do ponto entre as estações. a e b diferença estatística entre os pontos na mesma estação.



FONTE: Autor (2023).

É provável que existam diversos fatores que estão contribuindo para um menor tamanho e peso total das ostras coletas no ponto S2 (área de extrativismo), demonstrando que possivelmente as condições do ambiente (pH, salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido) têm influenciado no crescimento e na sobrevivência dos moluscos bivalves durante diferentes fases do ciclo de vida (FUNO *et al.*, 2015). Os maiores valores biométricos registrados para os animais da área de cultivo no período de estiagem tanto em relação à outra localidade quanto em relação ao período chuvoso refletem maior estabilidade energética e metabólica dos organismos frente ao aumento de salinidade (SANTOS *et al.*, 2021).

Em estudo experimental realizado por Funo *et al.*, (2015) sobre a influência da salinidade no crescimento e sobrevivência de ostras, verificou que os maiores valores biométricos registrados eram na salinidade de 25, para a altura, em salinidade de 20, para comprimento, salinidade de 20 à 25, para largura, salinidade de 20 à 30 para peso. Os autores averiguaram ainda que a melhor faixa de salinidade

para a sobrevivência dos organismos era de 20 a 25. Dessa forma, os valores registrados nas áreas S1, S2 e S3 não estão dentro da faixa citada pelo trabalho, onde as taxas de salinidade da área S1 esteve sempre acima de 28 e das áreas S2 e S3 apresentaram valores abaixo de 18,2.

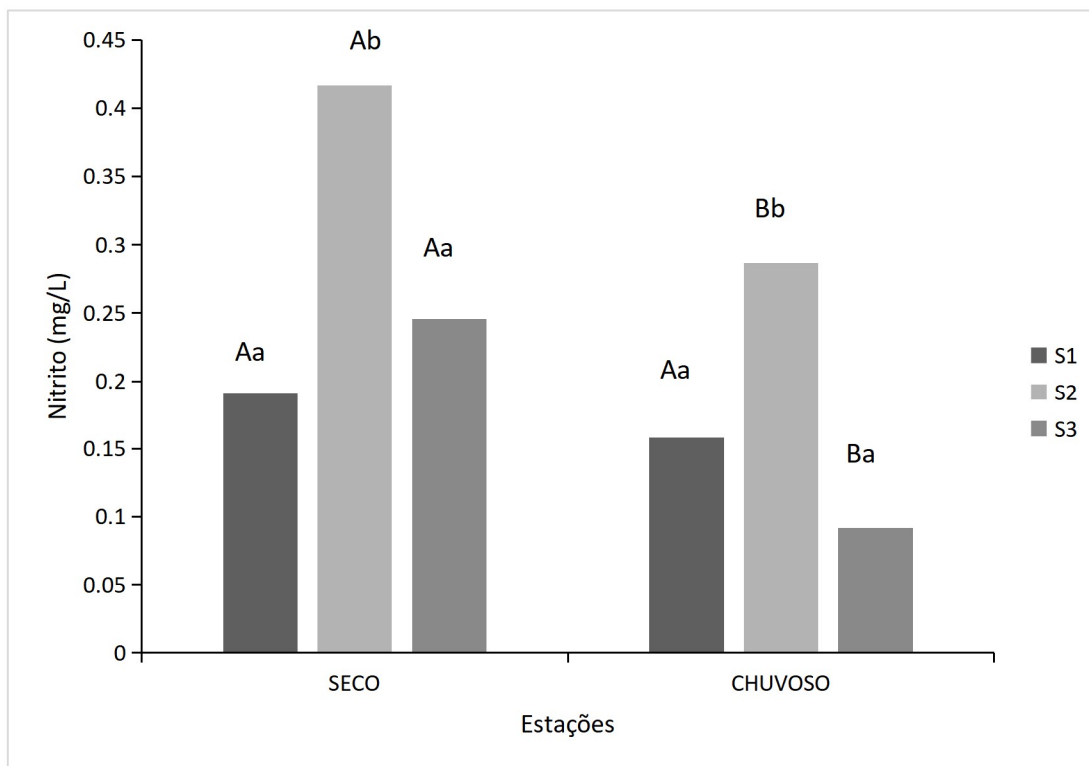
Segundo Noletto (2021), se o ambiente em que as ostras se encontram estiver impactado por contaminantes, seu desenvolvimento também pode ser afetado, apesar de serem organismos muito tolerantes a determinadas concentrações de compostos tóxicos, como pesticidas, metais pesados, hidrocarbonetos, entre outros.

É sabido que as ostras, assim como a maior parte dos moluscos aquáticos, são organismos osmoconformadoras (WILLMER *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2021) e por serem típicas de ambientes estuarinos apresentam alta capacidade de controle de seu volume celular (WILLMER *et al.*, 2004). Entretanto, uma vez submetidas a situações de estresse osmótico, podem reduzir a energia direcionada ao crescimento devido ao custo da demanda de sobrevivência (SANTOS *et al.*, 2021). Funo *et al.*, (2015) estudaram esse fenômeno, por meio de uma série de medidas e houve a diminuição da taxa de filtração, que afeta diretamente o crescimento das ostras (GUIMARÃES *et al.*, 2008).

5.3 Quantificação de nitritos (NO₂)

É a primeira vez que um estudo quantifica nitrito no sobrenadante de ostras do gênero *Crassostrea*. As análises foram feitas nas três áreas de estudo na Baía de São José (S1- Cultivo-Raposa , S2 - Extrativismo-Paço do Lumiar e S3 - São José de Ribamar). A figura 13 mostra a concentração de NO₂ no sobrenadante das ostras coletadas no período seco (outubro de 2022) e no período chuvoso (março de 2023).

Figura 13 - Média da concentração de nitritos no sobrenadante de ostras coletadas na Baía de São José no período seco (outubro de 2022) e no período chuvoso (março de 2023): S1) Área de cultivo (município de Raposa); S2) Área de extrativismo (município de Paço do Lumiar); S3) Área urbana (São José de Ribamar). A e B diferenças estatísticas do ponto entre as estações. a e b diferença estatística entre os pontos na mesma estação.



FONTE: Autor (2023).

Quando comparados os dois períodos (seco e chuvoso), houve diferença significativa na concentração de NO_2 no ponto S2 e S3 ($p=0,000319$ e $p=0,002305$, respectivamente) (figura 13).

Em relação aos resultados entre as áreas no período seco, houve diferença significativa entre os pontos S1 e S2 ($p=0,00012$) e entre S2 e S3 ($p=0,00012$). O período chuvoso também apresentou diferenças estatísticas entre os pontos S1 e S2 ($p=0,00016$) e S2 com S3 ($p=0,00012$).

O resultado das análises estatísticas mostra que a concentração de nitrito é maior no período seco, em todas as áreas estudadas (figura 13). Dessa forma, os dados levam a acreditar que o motivo para os valores mais elevados durante o período seco é devido à maior concentração de poluentes nessa época, que permite o acúmulo de matéria orgânica por muito tempo em um mesmo local. E quanto mais matéria orgânica concentrada em um único ponto, mais bactéria para oxidar amônia e

assim transformá-la em nitrito. Observamos que no período seco as ostras tendem a acumular mais sobrenadante, provavelmente isso deve-se ao fato das ostras neste período serem mais pesadas.

Em relação à água do mar, os resultados das leituras da quantificação de nitritos estão representadas na tabela 3, elas foram feitas nos meses de outubro de 2022 e março de 2023. A área S2 apresentou a maior quantidade de NO_2 no período de estiagem (0,262 mg/L) e no período chuvoso (0,109 mg/L) comparada as demais áreas, onde na estiagem houve uma quantidade maior de nitrito. O ponto S1 apresentou menor quantidade de nitrito entre os pontos em ambos os períodos, sendo que no período seco os valores foram mais elevados que no período chuvoso (tabela 3).

De acordo com os resultados obtidos, sugere-se que a maior concentração desse contaminante inorgânico na área S2 é devido à poluição no local, principalmente pela disposição inadequada de resíduos sólidos, uma vez que este ponto está inserido dentro de uma comunidade.

Tabela 3 – Leitura da quantificação de nitritos na água do mar na Baía de São José-MA em outubro de 2022 e março de 2023.

	Estiagem	Chuvoso
S1	0,047 mg/L	0,013 mg/L
S2	0,262 mg/L	0,109 mg/L
S3	0,060 mg/L	0,098 mg/L

S1: Cultivo de ostras, Raposa-MA; S2: Extrativismo, Paço do Lumiar-MA; S3:Área Urbana, São José de Ribamar-MA.

Segundo Barbieri *et al.*, (2014), os parâmetros abióticos da água, como temperatura, oxigênio dissolvido, entre outros, podem influenciar na ação dos nitritos. O pH tem uma relação direta com a formação da meta-hemoglobina, que é incapaz de transportar oxigênio aos tecidos, podendo estabelecer um quadro de hipoxia e cianose. Como o nitrito possui a capacidade de oxidar o átomo de ferro da hemoglobina e transformá-la em meta-hemoglobina, quanto maior o pH do meio, maior a toxicidade do nitrito. Neste trabalho o valor do pH manteve sempre 7,0 no sobrenadante das ostras, em ambos os períodos avaliados.

Na área urbana (S3) e na área de cultivo (S1), as concentrações dos

nitritos são menores, variando entre 0,092 mg/L e 0,245 mg/L. Até o momento não há uma regulamentação por meio da legislação brasileira ou outros trabalhos na literatura indicando valores mínimos aceitáveis desse composto para consumo humano. Porém, não podemos descartar a possibilidade de outros anormais marinhos estarem sendo afetados, visto que as ostras possuem uma grande resistência a compostos tóxicos (BARBIERI *et al.*, 2014).

O nitrato (NO_3) quando ingerido precisa ser reduzido em nitrito e depois em Óxido nítrico (NO). Fisiologicamente o NO caracteriza-se por ser uma molécula gasosa, rapidamente oxidada para nitrito e nitrato que pode ser quantificado no soro e outros fluidos biológicos como urina e homogeneizados de várias amostras, após desproteinização. O NO é essencial para a saúde e há pelo menos 3 origens ou fontes fisiológicas, a primeira é endógena, o NO é produzido a partir do aminoácido L-arginina e outros substratos e co-fatores. A segunda fonte de nitrito é obtida do nitrato presente nos vegetais, folhas verdes e tubérculos, além de alguns frutos, quando ingerido proveniente dessas fontes é prontamente decomposto para NO e outros óxidos de nitrogênio. A terceira fonte é a ingestão de água e produtos cárneos industrializados. Estudos sugerem que estes contribuem com cerca de 5% do total de nitrato ingerido e os vegetais contribuem com 80 a 87% do consumo e possivelmente a aplicação de fertilizantes na produção agrícola resultam em maior absorção de nitrogênio pelos vegetais. A água potável na Europa tem o valor de nitrato regulamentado em até 50mg/L e nos Estados Unidos esse valor cai para 44mg/L, a fim de prevenir a ocorrência de metahemoglobinemia infantil (OLIVO; RIBEIRO, 2018).

O nitrito atualmente apresenta um perigo devido a um uso global de nitrito de sódio para fins recreativos adicionados a ésteres alifáticos e suicidas, mostrando que o velho veneno está em uso nos dias atuais e representa um risco substancial para a sociedade. O método mais barato e mais utilizado para determinar o nitrito em envenenamentos fatais na medicina forense é o método de Griess (TUSIEWICZ *et al.*, 2023).

Este estudo é inovador, uma vez que é a primeira vez que o nitrito foi quantificado no sobrenadante das ostras. Esse fluido biológico caracteriza-se por ser translúcido e isento de proteínas sendo, portanto, prático, de fácil coleta e eficiente para estudos de monitoramento ambiental. O NO pode ser detectado utilizando vários métodos *in vitro* e *in vivo*, o método colorimétrico tem a vantagem de apresentar alta sensibilidade, precisão (accuracy), fácil acesso e econômico. O método de Griess foi descoberto em 1879, sendo o mais comum para a detecção de nitrito e nitrato *in vitro* devido a alta sensibilidade, baixo custo e extensivamente utilizado para análise de nitrito e nitrato (NO) em amostras de saliva, urina, soro, fluido cerebral

e culture média (GOSHI *et al.*, 2019).

Smith e Williams (1974) realizaram um experimento com duas espécies de peixes, o *Salmo gairdneri* e o *Oncorhynchus tshawytscha*, que foram expostos à água contendo nitrito nas concentrações de 0,15 e 0,55 mg/litro por 48 e 24 horas. Os autores constataram que ambos respondem fisiologicamente ao nitrito, produzindo meta-hemoglobina, mas somente na concentração de 55% ocorreu mortalidade. Também destacam que a toxidez do nitrito é mais baixa em águas salgadas. Corroborando assim com os resultados do presente estudo, em que as áreas com taxa de salinidade maior apresentaram menores quantidades de nitritos no sobrenadante das ostras e na água.

Huey *et al* (1980) também avaliaram os efeitos sub-letais em bagres juvenis de canais, expostos a 5 mg/litro de nitrito. A metemoglobina aumentou rapidamente durante as primeiras 6 horas de 7% para 59%. Nenhum dos peixes sobreviveu por mais de 24 horas. Mas quando transferidos para água sem nitrito apresentaram quantidades quase normais de meta-hemoglobina (13%) após 24 horas.

É possível observar que existe uma escassez de estudos relacionados à avaliação e análise desse composto nesses animais, o que foi verificado também por Barbieri *et al.*, (2014), que evidenciaram a pequena quantidade de estudos em relação à toxicidade de nitrito em moluscos bivalves.

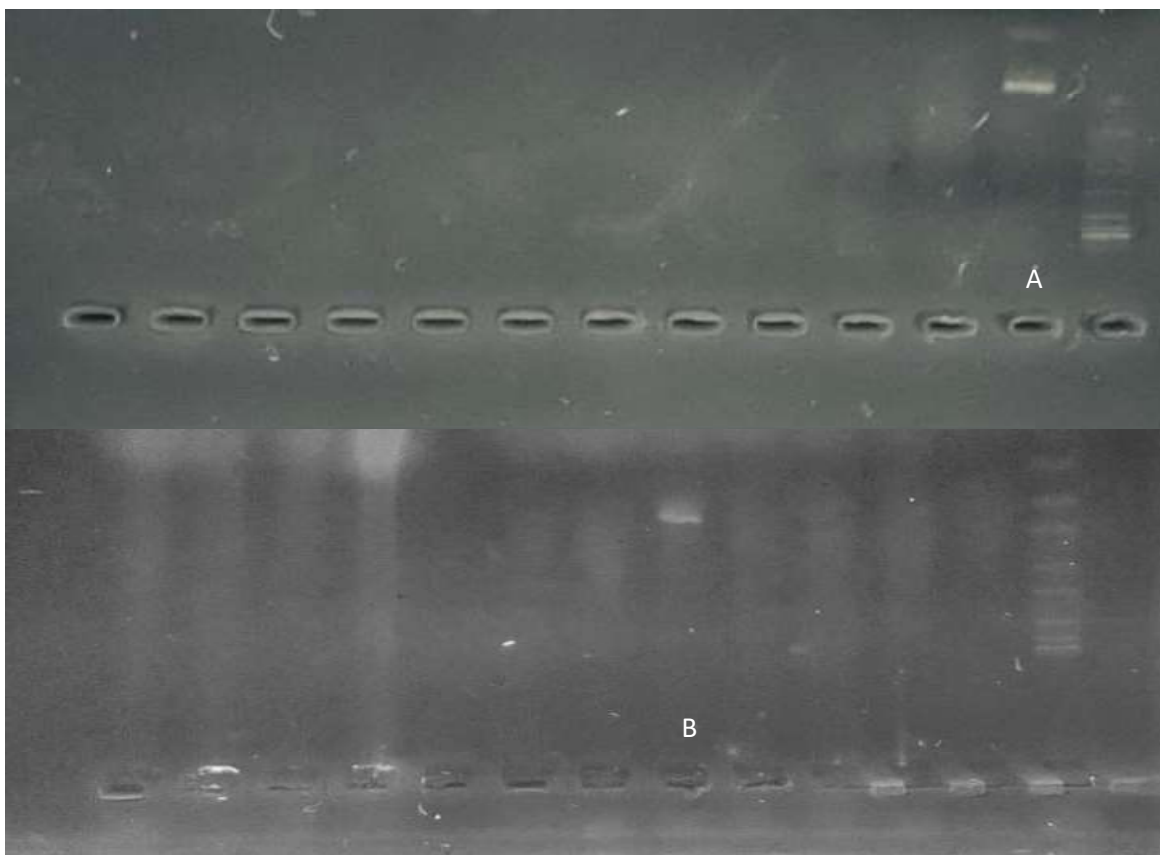
O único relato pretérito na literatura sobre a presença dos efeitos letais e sub-letais de nitritos em ostras *Crassostrea virginica* foi realizado por Epifanio e Sarna (1975), que observaram que este molusco bivalve possui uma elevada tolerância ao nitrito do que outros animais aquáticos. Os limites médios observados pelos autores para *C. virginica* foi de 1,081 a 2,415 mg/L, valores que são superiores aos encontrados na presente pesquisa, podendo indicar que os valores estão dentro de uma faixa média de tolerância na área de cultivo estudada.

Nossos resultados mostram uma maior concentração de nitritos nas ostras na área de extrativismo (S2) (período seco $0,41 \pm 0,7$ mg/L e período chuvoso $0,28 \pm 0,11$ mg/L), concentração que pode estar associada à exposição de substâncias tóxicas presentes na água do local, indicando que as ostras desta área estão expostas à maior concentração de poluentes. Dessa forma, utilização da quantificação de nitritos demonstra que os corpos d'água estão sujeitos à disposição inadequada de resíduos sólidos e descarte de efluentes domésticos que carregam substâncias potencialmente tóxicas, influenciando na saúde dos organismos.

5.4 Identificação molecular

As análises de identificação molecular foram iniciadas com as extrações de DNA das amostras dos três pontos (S1, S2 e S3), logo após houve realização da eletroforese para verificar o resultado das extrações. No qual, foi confirmado a presença de DNA nas amostras extraídas e assim seguimos para a etapa da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Porém, nesta fase apenas duas amostras foram amplificadas (figura 14).

Figura 14 – Gel de agarose a 1% corado com gel red mostrando amplificações obtidas pela PCR multiplex. A) amostra amplificada do ponto S2 (Extratativismo – Paço do Lumiar) correspondente a *Crassostrea rhizophorae*. B) amostra amplificada do ponto S3 (São José de Ribamar) correspondente a *Crassostrea gasar*.



FONTE: Autor (2024).

As amostras amplificadas evidenciaram a ocorrência de duas espécies diferentes na Baía de São José. Nas análises referente as amplificações, foi possível observar padrão de bandas que correspondem a *Crassostrea gasar* e *Crassostrea rhizophorae* (figura 14). Estudo realizado por Lopes *et al.*, (2018) já

havia confirmado a ocorrência dessas duas espécies no Litoral Maranhense, que até então apenas a *C gasar* tinha ocorrência confirmada no estado por Lazoski *et al.*, (2011). Melo *et al.*, (2010) e De Paula *et al.*, (2008).

Em seu trabalho, Lopes *et al.*, (2018) utilizou a técnica de PCR Multiplex, a mesma utilizada no presente trabalho. Ele destacou a importância de diferenciar as espécies de *Crassostrea* para a ostreicultura, uma vez que a *Crassostrea gasar* é a espécie que apresenta uma melhor taxa de crescimento, o que faz com que ela seja a melhor opção para o cultivo (ABSHERS, 1989).

Christo (2006), confirmou que as espécies *Crassostrea gasar* e *Crassostrea rhizophorae* possuíam distribuições diferentes no ecossistema aquático, que conseqüentemente não poderiam co-habitar no mesmo lugar. No entanto, Lopes *et al.*, (2018) constataram que as duas espécies residem no mesmo local, em São José de Ribamar e Paço do Lumiar, mesmos locais de estudo deste trabalho. É importante ressaltar que estes dois pontos possuem características distintas, já que São José de Ribamar é uma região de praia, com as ostras fixadas em rochas e estrutura de concreto, e Paço do Lumiar se caracteriza por ser um ambiente de estuário, com as ostras fixadas nas raízes das plantas. Neste mesmo trabalho, foi encontrada apenas a espécie *Crassostrea gasar* no município de Raposa (região do cultivo de ostras).

É esperado que a *Crassostrea gigas* e *Crassostrea* sp. Canela não sejam encontradas na Baía de São José. Isso porque de acordo com Tureck (2010) a primeira espécie é exótica da região do Indo-pacífico e não se adapta bem em regiões com altas temperaturas, como a que é característica do Maranhão. Já a *Crassostrea* sp. Canela, até o presente momento é exclusiva da região de Bragança- PA, que provavelmente por questões de barreiras naturais ainda não se dispersou para outras áreas.

Devido a pequena quantidade de amostras amplificadas na PCR não foi possível neste trabalho determinar as espécies nos pontos de amostragem.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluimos que os pontos S2 e S3 possuem baixo valor de oxigênio dissolvido, sugerindo que essas áreas possuem uma alta atividade microbiana fruto da decomposição da matéria orgânica. Em relação à análise biométrica, é possível observar que as ostras do extrativismo são menores em todas as dimensões, principalmente no período chuvoso. O período seco apresentou valores estatisticamente mais alto para nitrito na área de extrativismo (S2), considerando esta área a mais impactada, sugerindo uma maior contaminação antrópica. A cerca da identificação molecular, as etapas irão continuar até a metodologia ser consolidada e os possíveis erros serem corrigidos. Desta forma, é possível concluir que a análise físico-química da água somados a biometria e quantificação de nitritos são uma ferramenta eficaz, de baixo custo e rápida, que pode ser utilizada no monitoramento ambiental.

REFERÊNCIAS

- ABSHER, T. M. **Populações naturais de ostras do gênero *Crassostrea* do litoral do Paraná: desenvolvimento larval, recrutamento e crescimento**, 1989. 140p. Tese (PhD) - Instituto de Oceanografia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.
- ARCHER, D. L. Evidence that ingested nitrate and nitrite are beneficial to health. **Journal Food Protection**. 65(5): 872-875, 2002.
- ALMEIDA, Z. S.; CASTRO, A. C. L.; PAZ, A. C.; RIBEIRO, D.; BARBOSA, N.; RAMOS, T. D. Diagnóstico da pesca no litoral do estado do Maranhão. In: ISAAC, V. J; MARTINS, A. S; HAIMOVICI, M.; ANDRIGUETO-FILHO, J. M. A pesca marinha e estuarina do Brasil no início do século XXI: recursos, tecnologias, aspectos socioeconômicos e institucionais. **Editora Universitária**, Brasília. P. 41-65, 2006.
- AKAISHI, F. M. **Avaliação do Potencial Tóxico da Fração Solúvel de Petróleo em Água (FSA) em *Astyanax sp* Utilizando Biomarcadores de Contaminação** 2003. 141 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná, 2003.
- AMADO, L. L.; LONGARAY GARCIA, M.; RAMOS, P. B.; FREITAS, R. F.; ZAFALON, B.; RIBAS FERREIRA, J. L.; YUNES, J. S.; MONSERRAT, J. M. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the Total Environment**. 407: 2115–2123, 2009.
- ANDRADE, T. D. S. D. O M. **Biomarcadores em caranguejo uçá (*Ucides Cordatus*) para monitoramento Ambiental em áreas portuárias**, 2016. 153f. Dissertação do mestrado em Recursos Aquáticos e Pesca. Universidade Estadual do Maranhão-UEMA, 2016.
- BAINY, A. C. D.; SAITO, E.; CARVALHO, P. S. M.; JUNQUEIRA, V. B. C. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology**. 34: 151–162, 1996.
- BARBIERI, E.; MARQUES, H. L. de A.; BONDIOLI, A. C. V.; CAMPOLIM, M. B.; FERRARINI, A. T. Concentrações do nitrogênio amoniacal, nitrito e nitrato em áreas de engorda de ostras no município de Cananeia-SP: DOI: 10.15343/0104-7809.20143801105115. **O Mundo Da Saúde**, São Paulo. 38(1), 105-115, 2014
- BEDALE, W.; SINDELAR, J. J.; MILKOWSKI, A. L. Dietary nitrate and nitrite: Benefits, risks, and evolving perceptions. **Meat Science**. 120: 85-92, 2016
- BELTRÃO, M. C. **Relação entre indicadores ecológicos da meio-fauna de praias arenosas e a Qualidade Visual da Paisagem em uma futura Área de Proteção Ambiental numa orla da costa sul brasileira**, 2018. 53f. Tese (Ciências e Tecnologia Ambiental). Itajaí. 2018.

BENASSI, J. C. **O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação do processo de remediação de efluentes de lixiviação de carvão mineral utilizando microesferas de quitosana**, 2004. 106f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

BEUTLER, E. Red cell metabolismo: a manual of biochemical methods. **Yale Journal of biology and medicine**. New York: Grune e Stratton, p. 198, 1975.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano**. Brasília: Diário Oficial da União, 2006.

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.

BRYAN, N. S.; HORD, N. G. Dietary nitrates and nitrites: The physiological context for potential health benefits. In: Food, Nutrition and the Nitric Oxide Pathway: Biochemistry and Bioactivity. **DESTech Publications Inc., Lancaster PA**, p 238, 2010.

BUENO, L. F.; GALBIATTI, J. A.; BORGES, M. J. Monitoramento de variáveis de qualidade da água do Horto Ouro Verde-Conchal – SP. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 742-748, 2005.

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.

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.

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. 122f. Tese(Doutorado de Zoologia) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

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 de Guaratuba (Paraná- Brasil) - Publicatio UEPG: **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 1, p. 67-71, 2008.

COLT, J. E.; ARMSTRONG, D. A. **Nitrogen toxicity to crustaceans, fish, and molluscs**. 1981.

COUTINHO, A. **Influência da variação sazonal no valor nutricional e a avaliação da estabilidade da ostra do sado. Dissertação apresentada á Escola Superior de Turismo e Tecnologia e Mar**, 2012. 96f. Dissertação para o mestrado em Gestão da qualidade de segurança alimentar. Leiria: Instituto Politecnico de Leiria, 2012.

DE PAULA, N. R. F.; GOMES, L. A.; MELO, A. G. C.; BEASLEY, C. R.; TAGLIARO, C. H. Estudos populacionais de *Crassostrea gasar* do Pará e do Maranhão usando o gene COI. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA. 54., 2008, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Genética, p. 398, 2008.

EPIFANIO, C. E.; SRNA, R. F. Toxicity of ammonia, nitrite ion, nitrate ion, and orthophosphate to *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. **Marine Biol.** v.33, p. 241-6, 1975.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência. 2. ed, 48 p. 1998.

FRATUCCI, A; SILVA, L & GUEDES, M. C. S. Nitratos, nitritos e N- nitrosaminas: Efeito no organismo. (2020). **Revista Eletrônica FACP**, 6(12), 50–62. Disponível em: <<http://revista.facp.com.br/index.php/reFACP/article/view/56/pdf.2020>>. Acesso em: 19 mai. 2023.

FROELICH, B. A.; NOBLE, R. T. Factors affecting the uptake and retention of *Vibrio vulnificus* in oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p. 7454-7459, 2014.

GOMES, I. O. **Comunidade fitoplanctônica de São José de Ribamar – MA**. 2019. Monografia (Ciências Biológicas). Universidade Estadual do Maranhão. São Luís. 81p, 2019.

GOSHI, E.; ZHOU, G.; HE, Q. Nitric oxide detection methods in vitro and in vivo. **Medical Gas Research**, v. 9, p. 192-207, 2019.

GOYAL, M. M.; BASAK, A. Human catalase: Looking for complete identity. **Protein cell**, v. 1, n. 10, p. 888-897, 2010.

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

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Assay for differentiation of glutathione-S-transferases. **Methods in Enzymology**. 77: 398–405, 1981.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione-S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Biological Chemistry**. 249: 7130–7139, 1974.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Quantification of the lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylenol orange complex formation. **Free Radical Biology & Medicine**. 19: 271–280, 1995.

HUEY, D. W.; SIMCO, B. A e CRISWELL, D. W. Formação de metemoglobina induzida por nitrito em peixe-gato do canal. **Transações da American Fisheries Society**. 109: 558-562, 1980.

IAMMARINO, M; TARANTO, AD; CRISTINO, M. Endogenous levels of nitrites and nitrates in wide consumption foodstuffs: Results of five years of official controls and monitoring. **Food Chemistry**; 140:763-771, 2013

IGNACIO, B. L.; ABSHER, T. M.; LAZOSKI, C.; SOLÉ-CAVA, A. M. Genetic evidence of the presence of two species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) on the coast of Brazil. **Marine Biology**, v.136, n.6, p. 987-991, jan-jul. 2000.

JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 4. p. 680-693, 2008.

KOBAYASHI, J. Effect of diet and gut environment on the gastrointestinal formation of N-nitroso compounds: A review. **Nitric Oxide**. 28(73): 66-73, 2018.

LACERDA, L. M.; LIMA, L. F. S.; DO ROSÁRIO, C. J. R. M.; FERREIRA, P. T. R.; COSTA, T. F. Qualidade da água natural produzida em uma indústria no município de São José de Ribamar-MA. **Rev. Ars. Veterinária**. p. 12-17, 2021.

LAPÈGUE, S.; BOUTET, I.; LEITÃO, A.; HEURTEBISE, S.; GARCIA, P. THIRIOT-QUIÉVREUX, C.; BOUDRY, P. Trans-Atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16s mtDNA and karyological analyses. **The Biological Bulletin**, Woods Hole, v.202, n.3, p.232-242, 2002.

LAZOSKI, C.; GUSMÃO, J.; BOUDRY, P.; SOLÉ-CAVA, A. M. Phylogeny and phylogeography of Atlantic oyster species: evolutionary history, limited genetic connectivity and isolation by distance. **Marine Ecology Progress Series**, v.426, p. 197-212, 2011.

LENZ, T, D. M. **Biologia reprodutiva da ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) (Bivalvia: Ostreidae) como subsídio à implantação de ostreicultura na Baía de Camamu (BA)**, 2016. 54f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Sistemas Aquáticos Tropicais – Ecologia). Universidade Estadual de Santa Cruz, 2016.

LEON, L. L. et al. Poluição dos ecossistemas marinhos brasileiros: uma breve revisão sobre as principais fontes de impacto e a importância do monitoramento ambiental. **Unisanta BioScience**, v. 9, n. 3, p. 166-173, 2020.

LOPES, R. ANTÔNIO, I.; TCHAIKA, L.; BARROS, M.; FRAGA, E. Molecular identification of native oysters on the coast of Maranhão, Brasil. **Instituto de Pesca**, v. 44, n.4, p. 1-7, 2018.

LUSHCHAK V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, p. 13-30, 2011.

MACHADO, P. J. O.; VALLE, G. M.; RINCO, L.; CARMO, L. F. Z.; LATUF, M. O. **Qualidade das águas do Rio Paraibuna no trecho urbano de Juiz de Fora/MG**. Disponível em: <<http://www.virtu.ufjf.br/artigo%201a5.pdf>>. Acesso em: 15 de Out. 2022.

MAJOU, D.; CHRISTIEANS, S. Mechanisms of the bactericidal effects of nitrate and nitrite in cured meats. **Meat Science**.145: 273-284, 2018.

MANSON, C. F. Biology of freshwater pollution. 3rd. ed. **Harlow, Essex**, England: Longman, p. 356, 1996.

MARANHÃO. **Bacias hidrográficas**: subsídios para o planejamento e a gestão territorial. Universidade Estadual do Maranhão/Núcleo Geoambiental, São Luís: UEMA, 2011.

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.* **A bacia do Rio Tibagi**. Londrina: M. E. Medri, 2002.

MATSUZAKI, M.; MUCCI, J. L. N.; ROCHA, A. A. Comunidade fitoplanctônica de um pesqueiro na cidade de São Paulo. **Saúde Pública**, v.38, n.5, p.679- 686, 2004.

MEDRANO, J. F.; AESEN, E.; SHARROW, L. DNA Extraction from Nucleated RedBlood Cells. **Biotechniques**. V. 8; p. 43, 1990.

MELO, A. G. C.; VARELA, E. S.; BEASLEY, C. R.; SCHNEIDER, H., SAMPAIO, I.; GAFFNEY, P. M.; REECE, K. S.; TAGLIARO, C. H. Molecular identification, phylogeny and geographic distribution of Brazilian mangrove oysters (*Crassostrea*). **Genetics and Molecular Biology**. São Paulo, v. 33, n. 3, p.564–572, 2010.

MELO, M. A. D.; SILVA, A. R. B.; BEASLEY, C. R.; TAGLIARO, C. H. Multiplex species-specific PCR identification of native and non-native oysters (*Crassostrea*) in Brazil; a useful tool for application in oyster culture and stock management. **Aquaculture international**, v. 6, p. 1325-1332. Dez. 2013.

MIRANDA, R. G.; PEREIRA, S. D. F. P.; ALVES, D. T. V.; OLIVEIRA, G. R. Qualidade dos recursos hídricos da Amazônia-Rio Tapajós: avaliação de caso em relação aos elementos químicos e parâmetros físico-químicos. **Revista Ambiente & Água, Taubaté**, v. 4, n. 2, p. 75-92, 2009.

MIOSSEC, L.; DEUFF, R. M. L.; GOULLETQUER, P. Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). **ICES Cooperative Research Report**, n. 299, p. 46, 2009.

MONSERRAT, J. M.; MARTÍNEZ, P. E.; GERACITANO, L. A.; AMADO, L. L.; MARTINS, C. M.; PINHO, G. T. 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 part C: Toxicology and Pharmacology*. 146(1–2): 221–34, 2003.

MONSERRAT J.M., MARTINEZ P.E, & GERACITANO L.A. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. **Comp. Biochem Phys C**. v. 143, i. 2, p. 141-149, 2006.

MORATELLI JUNIOR, G. **Cultivo de molusco (ostra e mexilhão) - no sistema artesanal. Relatório de Estágio Supervisionado do Curso de Engenharia de Aquicultura**. Relatório de Estágio Supervisionado II do Curso de Engenharia de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

MORITZ, C.; CICERO, C. DNA barcoding: promise and pitfalls. **PLOS Biology**, San Francisco, v. 2, n. 10, p. 1529-1531, 2004.

MOREIRA, L. R. M. **Mytilus edulis e mytilus galloprovincialis: características e aquicultura**, 2008. 59f. Dissertação em Toxicologia e Ecotoxicologia. Universidade de Aveiro, 2008.

NASCIMENTO, J. E. F. et al. Variação sazonal de parâmetros físico-químicos na porção estuarina do município de Raposa – MA. **Interfaces Científicas: Saúde e Ambiente**, v. 8. n. 2, Aracaju, p. 257-271, 2020.

NOLETO, K. S.; OLIVEIRA, S. R. S.; LIMA, I. M. A.; DE JESUS, W. B.; CASTRO, J. S.; DE SANTANA, T. C.; CARDOSO, L. M.; JORGE, M. B.; SANTOS, D. M. S.; TORRES, J. R. S.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Biochemical and Histological Biomarkers in *Crassostrea* sp. (Bivalvia, Ostreidae) for Environmental Monitoring of a Neotropical Estuarine Area (São José Bay, Northeastern Brazil). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 106: 614-620, 2021.

NOLETO, K. S. **Biomarcadores bioquímicos em ostras do gênero *crassostrea* para monitoramento ambiental na Baía de São José-Maranhão**, 2018. 60f Dissertação do mestrado em Oceanografia da Universidade Federal do Maranhão-UFMA, 2018.

OLIVO, R.; RIBEIRO, L. G. T. Novos conceitos sobre nitratos e nitritos. (2018). **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR**. Vol. 24, n. 3, p.115-125, 2018.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). **Transformando nosso mundo: a Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável**. (2015). Nova York: ONU; 2015. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/pos2015/agenda2030/>. Acesso em: 23.maio.2022.

OSTRENSKY, A.; BOEGER, W. **Piscicultura: fundamentos e técnicas de manejo**. Guaíba: Agropecuária, 1998.

PERRONE, S.; NEGRO, S.; TATARANNO, M. L.; BUONOCORE, G. Oxidative stress and antioxidant strategies in newborns. **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**. 23(S3): 63 –65, 2010.

PIE, M. R.; RIBEIRO, R. O.; BOEGER, W. A.; OSTRENSKY, A.; FALLEIROS, R. M.; ANGELO, L. A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster species (*Crassostrea brasiliana*, *C. rhizophorae* and *C. gigas*; Bivalvia: Ostreidae) cultured in Southern Brazil. **Aquaculture Research**, Malden, v. 37, n.15, 2006, p.1598-1600. 2006.

RANZL, S. M. **Vibrio vulnificus em ostras (*crassostrea gigas*) em Santa Catarina: Caracterização genotípica e comparação da eficácia de métodos microbiológicos de detecção**, 2016. 201f. Tese submetida ao Programa de Pós Graduação em Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, 2016.

REECE, K. S.; CORDES, J. F.; STUBBS, J. B.; HUDSON, K. L.; FRANCIS, E. A.; Molecular phylogenies help resolve taxonomic confusion with Asian *Crassostrea* oyster species. **Marine Biology**, v.153, n.4, p. 709-721, 2008.

RIBEIRO, C. C. M. **Modulação natural de biomarcadores de estresse oxidativo em duas espécies de invertebrados com potencial para biomonitoramento**, 2018. 79f. Dissertação do mestrado em Ecologia Aquática e Pesca da Universidade Federal do Pará-UFPA, 2018.

RIBEIRO, L. G. T.; OLIVO, R. Ovo – ingerir ou não ingerir. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**. 17(1): 7-13, 2016.

RIOL, M. J. M.; VALIÑAS, M. C. N.; FERNÁNDEZ, M. A. G.; LÓPEZ, M. P. Glutathione Stransferases from Rainbow liver and freshly isolated hepatocytes: purification and characterization. **Comparat Biochem Phyliol**, p. 227-235, 2000.

RUPPERT, E. E. **Zoologia dos Invertebrados**. São Paulo, p. 1029, 1993.

RUPPERT, E. E. & BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. São Paulo: Roca. Ed. N. 6, p. 412-449, 1996.

SANTANA, L. L. **Hidrodinâmica estuarina - interação com a arquitetura das raízes de *Rhizophora mangle* (Nascimento 1983) e implicações para a dispersão e fixação de larvas de *Crassostrea rhizophorae* (Guilding 1828) no rio Ipojuca, Pernambuco, Brasil**, 2019. 118f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

SANTANA, L. MEDEIROS, C. Características biométricas e Índices de condição da ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) do estuário do rio Ipojuca, PE, Brasil. **Tropical Oceanography**. 48. 10.5914/tropocean.v48i1.247361, 2020.

SANTOS, E. B. R. **Ostras do gênero *crassostrea* como bioindicadores de poluição aquática na ilha de São Luís-MA**, 2018. 78f. Dissertação do mestrado em Ciencia Animal da Universidade Estadual do Maranhão-UEMA, 2018.

SANTOS, C. C. M.; COSTA, J. F. M.; SANTOS, C. R. M.; AMADO, L. L. Influence of seasonality on the natural modulation of oxidative stress biomarkers in mangrove crab *Ucides cordatus* (Brachyura, Ucididae). **Journal Elsevier**. 227: 146-153, 2019.

SANTOS, M. E. M. FERREIRA, C, N. Influência das variáveis ambientais sobre a macrofauna bêntica de praias arenosas. **Ciência e Natura**, v. 41, n. 5, 2019.

SANTOS, C. C. M.; FERREIRA, J. A.; SANTOS, C. R. M.; AMADO, L. L. Seasonal modulation of oxidative stress biomarkers in mangrove oyster (*Crassostea gasar*) from na Amazon estuary. **Journal Elsevier**. 257: 1-9, 2021.

SILVA, J. D. S.; ROCHA, I. K. B. S.; FREITAS, L. C.; PEREIRA, N. J.; NETA, R. N. F. C. Princípios bioéticos aplicados aos estudos ecotoxicológicos aquáticos. **Rev. Bioética**. Vol. 23, n2, p.409-418, 2015.

SILVA, O.L.L.; *et al.* Effects of environmental factors on microbiological quality of oyster farming in Amazon estuaries. **Aquaculture Reports**, v. 18, p. 1-10, 2020. DOI: 10.1016/j.aqrep.100437, 2020.

SILVA, A.N. O Turismo e suas Práticas Socioespaciais: o caso de Raposa – Maranhão. **Revista Equador (UFPI)**. v.9. n.4. 214-236, 2020.

SINDELAR, JJ; MILKOWSKI, AL. Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: a review of curing and examining the risk/benefit of its use. American Meat Science Association (AMS), **White Paper Series**. 3: 1-11, 2011.

SINDELAR, JJ; MILKOWSKI, AL. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. **Nitric Oxide**. 26: 259-266, 2012.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. **Limnologia aplicada à aquicultura**. São Paulo: FUNEP, 1994.

SMITH CE, WILLIAMS WG. Experimental Nitrite Toxicity in Rainbow Trout and Chinook Salmon. **Trans Am Fish Soc**. v.103, n 2, p.389-90, 1974.

SOUZA, J. S. A. Contaminação de corpos hídricos urbanos por efluentes domésticos e impactos á biodiversidade. **Rev. Multidisciplinar de educação e meio ambiente**. p. 123-135, 2021.

STAP. Scientific And Technical Advisory Panel of the Global Environment Facility. **The use of bioindicators, biomarkers and analytical methods for the analysis of POPs in developing countries**. Disponível em: <<http://www.unep.org/stapgef>>. Acesso: 24 jun. 2016, 2004.

TUSIEWICZ, K.; KUROPKA, P.; WORKIEWICZ, E.; WACHEŁKO, O.; SZPOT, P.; ZAWADZK, M. Nitrites: An Old Poison or a Current Hazard? Epidemiology of Intoxications Covering the Last 100 Years and Evaluation of Analytical Methods. **Toxics**, v. 11, p. 1-21, 2023.

URBINA, M. A.; GLOVER, C. N. Effect of salinity on osmoregulation, metabolism and nitrogen excretion in the amphidromous fish, inanga (*Galaxias maculatus*). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 473: 7–15, 2015.

VENICE-SYSTEM. Final resolution of the symposium on the classification of brackish Waters. **Archive of Oceanography Limnology**, 11 (supl.): p. 243-248, 1959.

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.

WARD, R. D.; HANNER, R.; HEBERT, P. D. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. **Journal of Fish Biology**, v. 74, n. 2, p. 329-356, 2009.

WILHELM FILHO, D.; TRIBESS, T. B., GÁSPARI, C. et al. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). **Aquaculture**, v. 203, p. 149-158, 2001.

WILLMER, P.; STONE, G.; JOHNSTON, I. Environmental Physiology of Animals. **Blackwell, Oxford, England**, 2^aed, 2004

ZAR, J. H. Biostatistical analysis. **Prentice Hall, New Jersey**, 2^o ed, 1984.

APÊNDICE

Parte dos resultados apresentados nesta dissertação foi submetido para publicação na revista "Comparative Biochemistry and Physiology, Part A", Qualis A1 na área da Biodiversidade e JCR 2.3.

Título encaminhado: **"QUANTIFICATION OF NITRITE IN BIOLOGICAL FLUID FROM OYSTERS (*Crassostea* sp.) AS AN ENVIRONMENTAL MONITORING TOOL"**

Comparative Biochemistry and Physiology, Part A
Quantificação de nitrito em fluido biológico de ostras (*Crassostea* sp.) como
ferramenta de monitoramento ambiental
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Section/Category:	Physiological Ecology
Keywords:	Biomonitoring; pollution indicators; aquatic contaminants; water quality; bivalve
Corresponding Author:	Geane da Silva Castro, especialista Universidade Estadual do Maranhão São Luís, Maranhão BRAZIL
First Author:	Geane da Silva Castro, especialista
Order of Authors:	Geane da Silva Castro, especialista Sildiane Martins Cantanhêde Isabel Vitória Figueiredo Raimunda Nonata Fortes Carvalho-Neta Ligia Tchaicka Sandra Fernanda Loureiro de Castro Nunes
Abstract:	The responses of organisms as an environmental monitoring tool have been used by organisms sensitive to changes that occur in the environment. Among the organisms used as biomonitors, oysters stand out, which accumulate large amounts of contaminants in their tissues. In this sense, this research aimed to determine the physical-chemical parameters of seawater at three points in São José Bay, Maranhão - Brazil, performing biometry of oysters of the genus <i>Crassostrea</i> and evaluating the anthropic impact through the quantification of nitrites. For this, oysters of the genus <i>Crassostrea</i> were collected in the dry period in October 2022 and the rainy period in March 2023. During the time of each collection (low tide), the physical-chemical parameters of the water were recorded at all sampling points and Compared to CONAMA Resolution No. 357/2005, 2 ml of seawater was also collected at three sampling points for NO ₂ -quantification. The nitrite present in the oysters' supernatant was partially produced through the occurrence of Griess, which quantifies nitrites. Analyzes of the physical-chemical parameters of seawater demonstrated that pH and temperature remained within established limits, except during the rainy season in the extractive area. The concentration of oxygen distributed remained low at all collection points. In the biometric analysis, it is possible to observe that oysters from extractivism are smaller in all dimensions, especially in the rainy season. The result of nitrite quantification in the oyster supernatant revealed significantly higher concentrations in the extraction area (dry period 0.41 ± 0.7 mg/L and rainy period 0.28 ± 0.11 mg/L), showing that this area is the most impacted. Therefore, the results found indicate that the quantification of nitrites is an innovative, simple, effective and low-cost tool that can be used in environmental monitoring in addition to the physical-chemical parameters of water and biometric analysis.
Suggested Reviewers:	Qianjun He Shenzhen University nanoflower@126.com oyster physiology specialist Elzbieta Workiewicz CSIR-Indian Institute of Toxicology Research elzbieta.workiewicz@gmail.com oyster physiology specialist Ana Paula Cuzziol Boccioni Universidad Nacional del Litoral

	anapaulacuzzioboccioni@gmail.com oyster physiology specialist
	Marcelo Oliveira Lima Federal University of Para marcelolima@iec.gov.br biochemistry specialist
	Lilian Lund Amado Universidade Federal do Para lilian.amado@gmail.com biochemistry specialist
	Rossileide Rocha Universidade Federal do Para mrocha.fpa@icloud.com Physiology specialist
Opposed Reviewers:	

Quantification of nitrite in biological fluid from oysters (*Crassostea* sp.) as an environmental monitoring tool

Geane da Silva Castro^{a, b, d}, Sildiane Martins Cantanhêde^c, Isabel Vitória Figueiredo^e, Raimunda Nonata Fortes Carvalho-Neta^{a, f}, Ligia Tchaicka^{a, d, f}, Sandra Fernanda Loureiro de Castro Nunes^{a, b, f}*

^aPrograma de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil.

^bLaboratório de Bioquímica e Ecotoxicologia, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil.

^cLaboratório de Ecotoxicologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil.

^dLaboratório de Biodiversidade Molecular, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil.

^eFaculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

^fDepartamento de Biologia, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil.

*Corresponding author: Sandra Fernanda Loureiro de Castro Nunes⁶. E-mail: sfnunes@hotmail.com; Telephone: +55 98 97000-4333.

Abstract

The responses of organisms as an environmental monitoring tool have been used by organisms sensitive to changes that occur in the environment. Among the organisms used as biomonitors, oysters stand out, which accumulate large amounts of contaminants in their tissues. In this sense, this research aimed to determine the physical-chemical parameters of seawater at three points in São José Bay, Maranhão - Brazil, performing biometry of oysters of the genus *Crassostrea* and evaluating the anthropic impact through the quantification of nitrites. For this, oysters of the genus *Crassostrea* were collected in the dry period in October 2022 and the rainy period in March 2023. During the time of each collection (low tide), the physical-chemical parameters of the water were recorded at all sampling points and compared to CONAMA Resolution No. 357/2005, 2 ml of seawater was also collected at three sampling points for NO₂⁻ quantification. The nitrite present in the oysters' supernatant was partially produced through the occurrence of Griess, which quantifies nitrites. Analyzes of the physical-chemical parameters of seawater demonstrated that pH and temperature

remained within established limits, except during the rainy season in the extractive area. The concentration of oxygen distributed remained low at all collection points. In the biometric analysis, it is possible to observe that oysters from extractivism are smaller in all dimensions, especially in the rainy season. The result of nitrite quantification in the oyster supernatant revealed significantly higher concentrations in the extraction area (dry period 0.41 ± 0.7 mg/L and rainy period 0.28 ± 0.11 mg/L), showing that this area is the most impacted. Therefore, the results found indicate that the quantification of nitrites is an innovative, simple, effective and low-cost tool that can be used in environmental monitoring in addition to the physical-chemical parameters of water and biometric analysis.

Keywords: Biomonitoring; pollution indicators; aquatic contaminants; water quality; bivalve.

1. Introduction

Monitoring aquatic ecosystems, through the use of physical-chemical parameters of water, constitutes an important tool for monitoring the quality of the environment (Silva, 2015).

However, methods that enable a more complete analysis of environmental variables and their effects in an efficient and low-cost manner should be added to aquatic environmental monitoring (Santos and Ferreira, 2019).

Among the tools, the quantification of ionic species, such as nitrite (NO_2^-), an inorganic substance present in aquatic organisms and water, has proven to be a new biochemical method, which can be added to environmental biomonitoring. Nitrite comes from acid rain and is also used as a preservative in the food industry. This has high relevance in biological fluids, forensic studies and food safety, since excessive consumption, from processed meat, can be harmful to human health, mainly causing gastric cancer. This occurs because secondary amines of proteins can react with nitrite (NO_2^-), forming nitrosamines, in the case of heating and/or acidic pH, causing toxicity in the body (Colt and Armstrong, 1981).

There is a scarcity of studies related to the evaluation and analysis of nitrites in aquatic animals. One of the few works found in the literature on the study of the effects of nitrites on fish was that of Smith and Williams (1974), where they verified the presence and lethality of this inorganic contaminant in fish. The scarcity is even greater when it comes to bivalve molluscs, where to date the only research found has been on the effects of nitrite on *Crassostrea virginica*, carried out by Epifanio and Sarna (1975).

Bivalve molluscs accumulate large amounts of contaminants in their tissues. However, it is through their filter feeding habit that these invertebrates become susceptible to the incorporation of contaminants (Ribeiro, 2016). Therefore, contaminants tend to accumulate in bivalve tissue, in concentrations greater than those found at the source of exposure. Therefore, filter-feeding bivalve molluscs are animals with high potential to be used as a biological model in the biomonitoring of aquatic ecosystems (Kaouli, 2016; Noleto, 2021).

Oysters of the genus *Crassostrea* are part of the Class Bivalvia of the phylum Mollusca. They are characterized by the presence of a shell composed of two valves that

cover the entire body (Ruppert and Barnes, 1996). The majority of oyster species in this genus are found in shallow coastal regions (Adanson, 1757).

Take into consideration the initial assumptions, this work aims to determine the physicochemical parameters of seawater at three points in São José Bay, Maranhão - Brazil, perform biometrics of oysters of the genus *Crassostrea* and evaluate the anthropic impact through the quantification of nitrites.

2. Materials and methods

2.1. Sampling areas

The collection points are located in São José Bay, on the north coast of the island of São Luís, Maranhão. São José Bay is of great importance for fishing in Maranhão, as there are several ports for landing and selling fish in this region, and a large part of the community survives from the sale of oysters of the genus *Crassostrea*.

Collections were carried out at three points: S1) Oyster cultivation area, located in the municipality of Raposa; S2) Extraction area, located in the municipality of Paço do Lumiar; S3) Urban area, located in the municipality of São José de Ribamar (Figure 1).

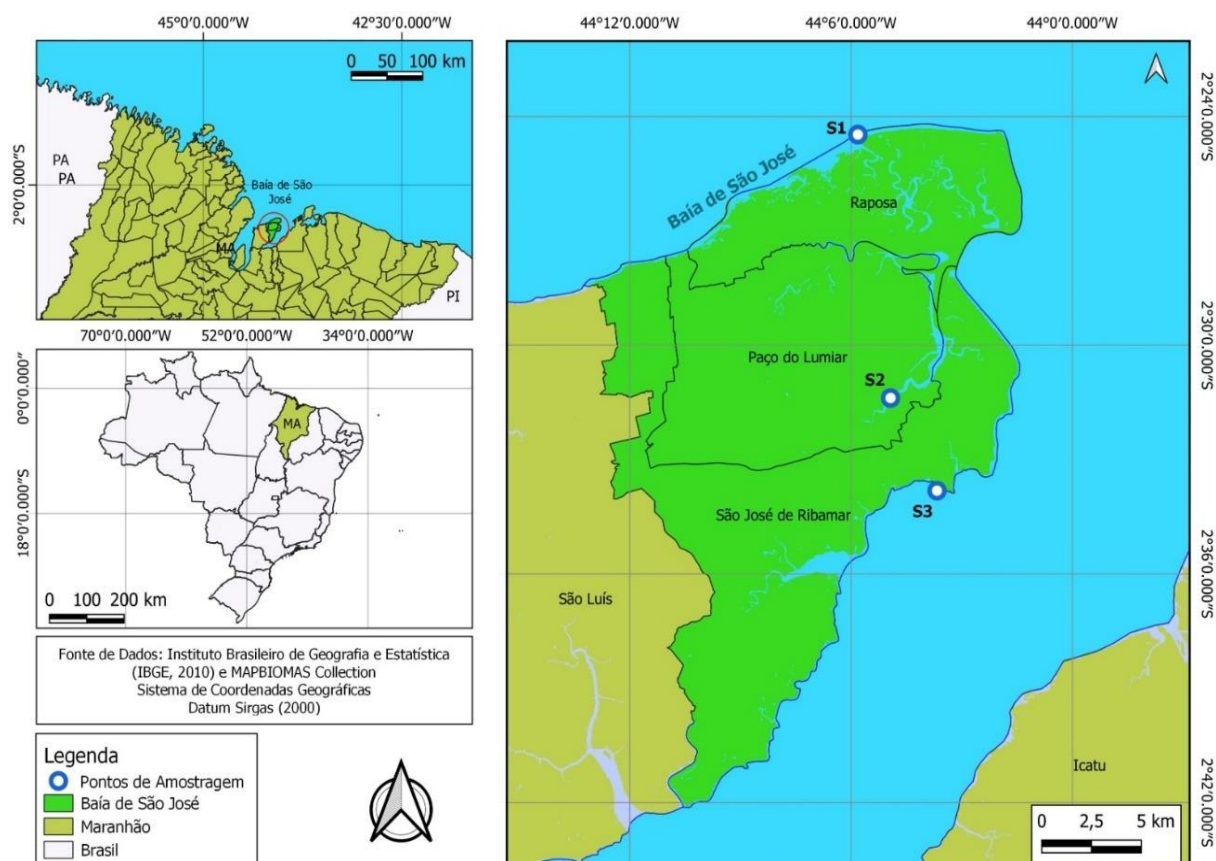


Fig. 1. Collection points in São José Bay, Maranhão: S1) Cultivation area (municipality of Raposa); S2) Extraction area (municipality of Paço do Lumiar); S3) Urban area (São José de Ribamar).

In the Cultivation Area (S1), oysters are sold throughout the large island, while in the Extraction (S2) and Urban (S3) areas, oysters are used for personal consumption.

2.2. *Field activities*

Two collections were carried out, one in the dry period (October 2022) and one in the rainy period (March 2023). At each point, 20 oysters were collected by free manual collection during low tide. Immediately after capture, the individuals were cryoanesthetized on ice (0°C) and transported to the laboratory for biometric analysis and removal of the supernatant for NO₂⁻ analysis. During collection, adult animals were prioritized. The physical-chemical parameters of the water were measured at the time of collection using the HANNA model multiparameter: salinity, pH, dissolved oxygen, conductivity and water temperature. At each point, 2ml of seawater was collected for NO₂ quantification.

2.3. *Biometric analysis*

In the laboratory, on the same day of collection, the animals were measured using a caliper (0.01 mm). The dimensions analyzed were the greatest width of the valves in frontal view, the length and height of the valves (figure 2). The total weight of the animals was obtained using a semi-analytical scale (0.01g). All samples were registered in the Maranhão Fauna Tissue and DNA Collection (CoFauMA) located at the State University of Maranhão.

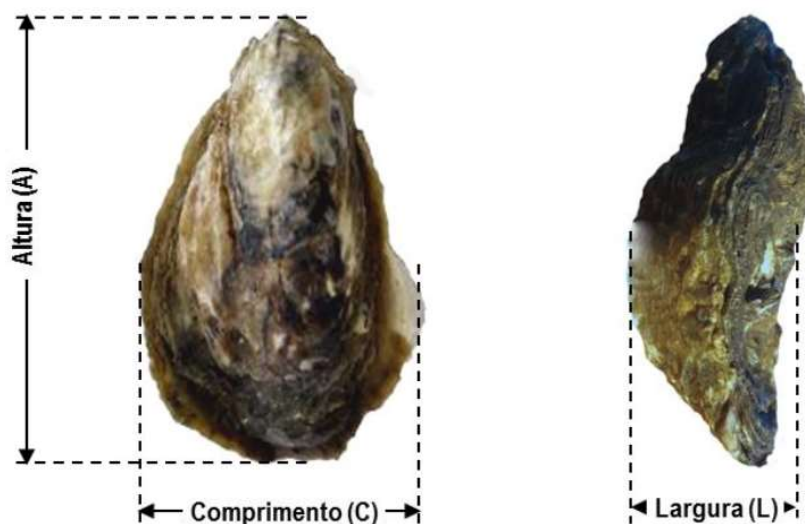


Fig. 2. Biometric measurement scheme for oysters of the genus *Crassostrea* sp (height, length and height). Fonte: Santana (2019).

2.4. Quantification of nitrites (curve 1.3.23 mg/L)

In the laboratory, the supernatant from the oysters was removed using an automatic pipette, placed in eppendorf-type tubes and frozen at -20°C for subsequent nitrite analysis. On the day of biochemical quantification, 500µl samples were thawed and centrifuged at 3,000rpm for 20 minutes in a refrigerated centrifuge (Excelsa 4. Mod. 280R - FANEM). Subsequently, 250µl of the supernatant was transferred to plastic cuvettes and 250µl of Griess reagent was added. The samples were placed in a dark place at room temperature for 10 minutes for color development and the absorbance was determined by spectrophotometry (AJMICRONAL-AJX-1000) at a wavelength of 540nm. All samples were tested in duplicate or triplicate.

The nitrite present in the supernatant was quantified using the Griess reaction, based on the methodology described by GREEN et al. (1982). This reaction forms a chromophore during the reaction of nitrites with sulfanilamide and N (- 1-naphthyl) ethylenediamine, forming a pink-colored compound, which was quantified in a spectrophotometer.

Nitrite concentration was determined by comparison with a calibration curve, using a standard sodium nitrite solution in a concentration range of 0.2 to 2 mg/L.

2.5. Statistical analysis

For statistical analysis, the Statistic® test was used to verify significant differences between collection locations and climatic periods, being considered significant when the p value < 0.05.

3. Results

3.1. Physicochemical analysis of water

The results of the abiotic data are shown in table 1. The water temperature of the sampled points is within the values established by CONAMA Resolution No. 357/2005 (BRASIL, 2005) for brackish water, except in the extractivism area (S2) of the period rainy, which is below the recommended level.

Table 1. Abiotic data recorded at three points in São José Bay-MA, in the dry and rainy seasons.

Parameters	Dry (October/2022)			Rainy (March/2023)			Recommended values
	S1	S2	S3	S1	S2	S3	CONAMA N°357
Temperature (°C)	29,3	29,7	28,6	29,9	27,1	28,4	28 - 32°C
pH	7,81	7,33	8,04	7,34	6,93	7,22	6,5 - 8,0
O2 dissolved (mg/L)	5,3	4,8	5,1	4,2	4,1	4,6	>5 mg/L
Salinity (g.kg ⁻¹)	36,7	16,7	18,2	28,2	16,1	16,2	>30%

S1: Oyster cultivation, Raposa-MA; S2: Extractivism, Paço do Lumiar-MA; S3: Urban Area, São José de Ribamar-MA.

Regarding the pH parameter, the values varied between 6.93 and 8.04, in accordance with CONAMA Resolution No. 357/2005 (Brasil, 2005).

We observed that at the sampled points, dissolved oxygen concentrations are below the levels permitted by current legislation. Only point S1 (cultivation area) and the Urban area (S3) in the dry period are within acceptable values. The low values of dissolved oxygen in the areas studied indicate the presence of organic matter in the environment, possibly coming from untreated domestic sewage, in addition to inadequate disposal of solid waste on site.

The salinity of the points varied between 16.1 g.Kg⁻¹ and 36.7 g.Kg⁻¹, where only the cultivation point (S1) in the dry period is in accordance with the legislation. The low salinity at all sampling points is below that recommended by legislation, this is due to the fact that they are brackish waters, which are probably heavily influenced by river water.

3.2. Oyster biometrics

The biometric data of the oysters are represented in figure 3. The results showed that the total weight, height, length and width of the oysters collected at the point in the cultivation area (S1) presented significantly higher values in relation to oysters from the points in the extraction area (S2) and urban (S3).

Oysters from area S2 presented the lowest values in all dimensions analyzed, when compared to points S1 and S3, except for length in the dry period.

The total weight of oysters at point S1 varied between $39.20 \text{ g} \pm 12.53$ and $36.4 \text{ g} \pm 13.4$, at S2 from $19.25 \text{ g} \pm 6.7$ to $16.75 \text{ g} \pm 5.24$ and at point S3 from 25.22 ± 7.5 to 20.26 ± 3.7 . It was found that oysters in the dry period are heavier and consequently accumulate more supernatant. There was no statistically significant difference in the weight of oysters from the 3 points between the two seasonal periods (dry and rainy). However, when comparing the weight in the same period, the oysters collected at point S1 were heavier than oysters from points S2 and S3, both in the dry ($p=0.00012$) and rainy ($p=0.00012$) periods. . When comparing oysters from points S2 and S3, it was found that there was no significant difference in both seasonal periods.

The oysters presented variable heights throughout the three collection areas (figure 3). The height of oysters at point S1 varied between 6.55 ± 0.7 and 5.61 ± 1 cm, at point S2 between 4.52 ± 0.8 and 4.45 ± 0.6 cm and at point S3 between 5.39 ± 0.7 and 4.65 ± 0.4 cm. There were significant differences in points S1 and S3 between the different periods ($p=0.00199$ and $p=0.03652$ respectively), with the oysters being taller in the dry period. A significant difference was also observed between all points in the dry period, with oysters from S1 being higher (between S1 and S2 $p=0.000119$, between S1 and S3 $p=0.000223$ and between S2 and S3 $p=0.007561$). During the rainy season, the height of oysters from S2 and S3 were statistically similar.

The length of oysters at point S1 varied between 4.015 ± 0.6 and 3.91 ± 0.8 cm, at point S2 between 3.87 ± 2.1 and 2.89 ± 0.6 cm and at point S3 between 3.68 ± 0.5 and 3.29 ± 0.3 cm. In the dry period, the oysters with the greatest length were from point S1, followed by S2 and finally S3, in this same period there was a significant difference between points S1 and S2 ($p=0.035$). In the rainy season, oysters from S2 and S3 had statistically similar length dimensions. Oysters from point S1 had greater length compared to oysters from S2 ($p=0.00013$) and S3 ($p=0.024874$).

The width values of the oysters analyzed in area S1 varied respectively between 1.79 ± 0.4 and 1.7 ± 0.7 cm. In area S2, this variation was 1.38 ± 0.3 and 1.25 ± 0.3 cm. In

area S3, oyster width values were between 1.83 ± 0.8 and 1.51 ± 0.3 cm (figure 3). No statistical differences were found in the width of oysters between the 3 points in the same period, nor between the points in the seasonal periods (dry and rainy).

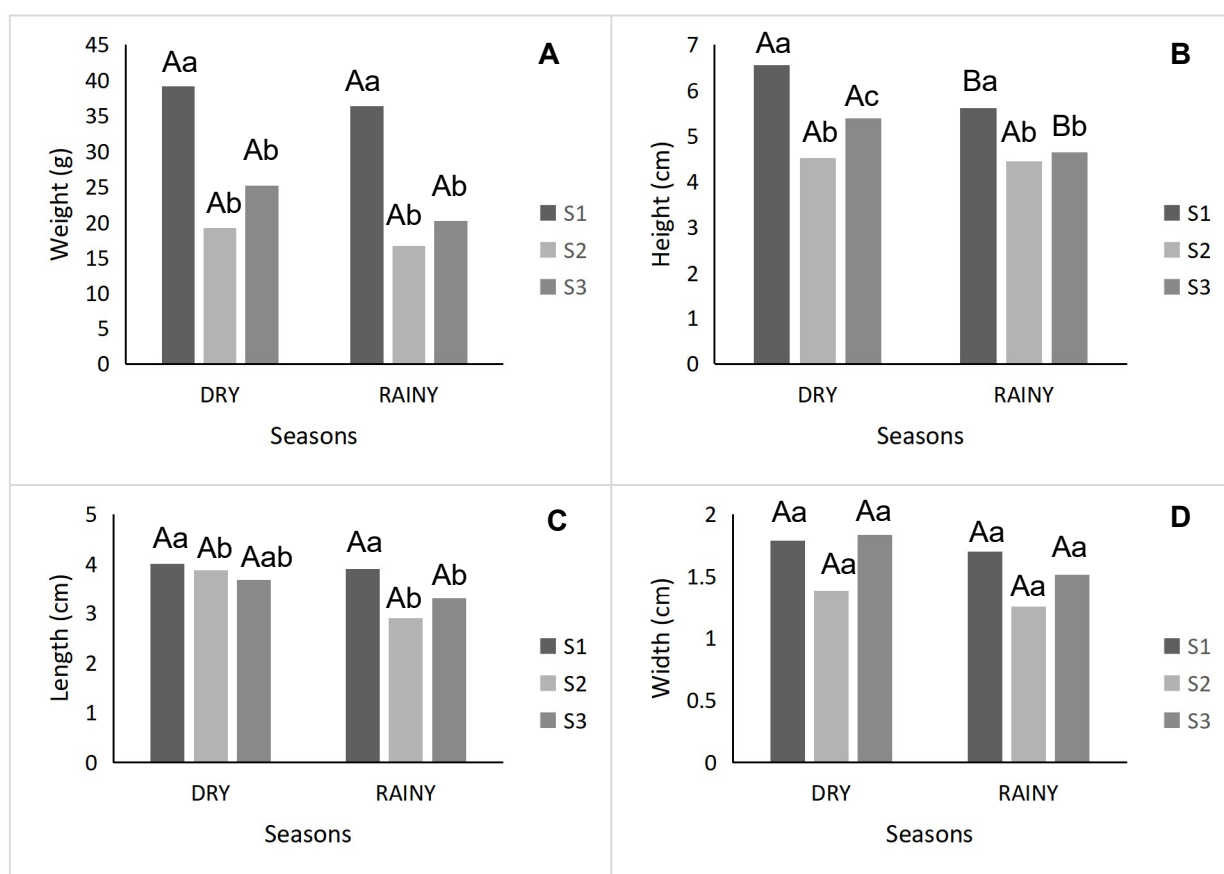


Fig. 3. Biometrics of oysters collected in São José Bay in the dry season (October 2022) and in the rainy season (March 2023). A) Average total weight. B) Average height. C) Average length. D) average width: S1) Cultivation area (municipality of Raposa); S2) Extraction area (municipality of Paço do Lumiar); S3) Urban area (São José de Ribamar). A and B point statistical differences between stations. a, b and c statistical difference between points in the same station.

2.3. Quantification of nitrites

The analysis of nitrites in the supernatant of oysters at the extraction point (S2) showed a higher concentration of NO_2^- in both seasonal periods, as shown in figure 4.

When comparing the two periods (dry and rainy), there was a significant difference in the concentration of NO_2^- at points S2 and S3 ($p=0.000319$ and $p=0.002305$, respectively) (figure 4).

Regarding the results between areas in the dry period, there was a significant difference between points S1 and S2 ($p=0.00012$) and between S2 and S3 ($p=0.00012$). The rainy period also showed statistical differences between points S1 and S2 ($p=0.00016$) and S2 with S3 ($p=0.00012$).

The result of statistical analyzes shows that nitrite concentration is higher in the dry period, in all areas studied (figure 4). Therefore, the data leads us to believe that the reason for the higher values during the dry period is due to the higher concentration of pollutants at this time, which allows organic matter to accumulate for a long time in the same location. And the more organic matter concentrated in a single point, the more bacteria to oxidize ammonia and thus transform it into nitrite. We observed that in the dry period oysters tend to accumulate more supernatant, probably due to the fact that oysters in this period are heavier.

Figure 4 shows the concentration of NO_2^- in mg/L in the oyster supernatant.

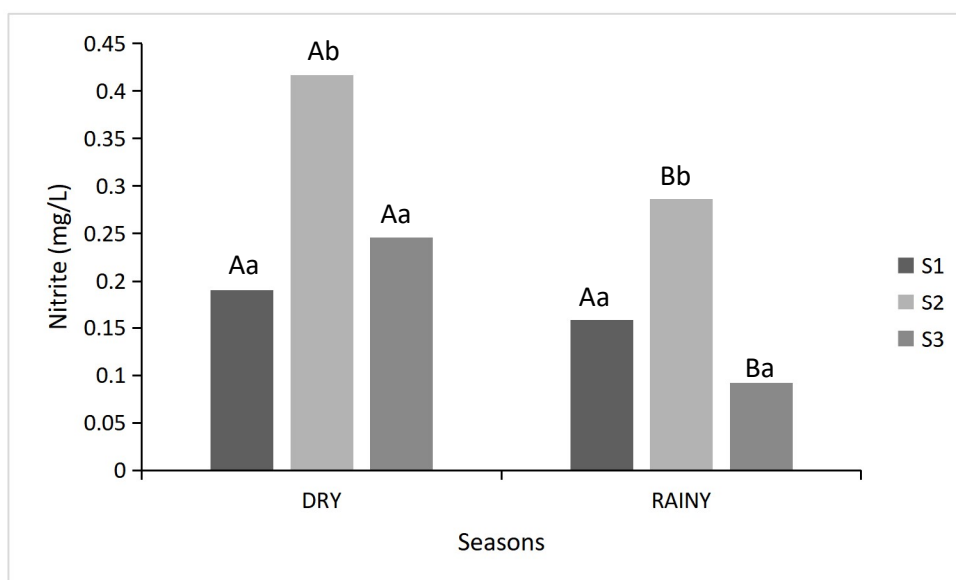


Fig. 4. Average nitrite concentration in the supernatant of oysters collected in São José Bay in the dry season (October 2022) and in the rainy season (March 2023): S1) Cultivation area

(municipality of Raposa); S2) Extraction area (municipality of Paço do Lumiar); S3) Urban area (São José de Ribamar). A and B point statistical differences between stations. a and b statistical difference between points in the same station.

Regarding the nitrite reading in seawater, the results are represented in table 2. Point S2 presented the highest amount of NO_2^- in the dry period (0.262 mg/L) compared to the other areas in the same period. Point S1 presented the lowest amount of nitrite among the points in both periods (table 2).

Table 2. Reading of nitrite quantification in seawater in São José Bay-MA in the dry season (October 2022) and in the rainy season (March 2023).

	Dry	Rainy
S1	0,047 mg/L	0,013 mg/L
S2	0,262 mg/L	0,109 mg/L
S3	0,060 mg/L	0,048 mg/L

S1: Oyster cultivation, Raposa-MA; S2: Extractivism, Paço do Lumiar-MA; S3: Urban Area, São José de Ribamar-MA.

4. Discussion

4.1. Physicochemical analysis of water

According to Nogueira, Costa and Pereira (2015), water temperature can be influenced by air temperature, directly implying less intense water variations, since during this dry period temperatures tend to be warmer. Surface temperature is influenced by factors such as latitude, altitude, season, time of day, flow and depth. Temperature can also influence the physiological activities of animals that live there, such as breathing, reproduction and digestion (Rebouças et al., 2014).

The pattern of high temperatures can be explained by the fact that Maranhão is located close to the Equator, making the region hot throughout the year, with no evident thermal variations, even with the occurrence of rain (Gomes, 2019). The lower temperature in the rainy season is the result of the greater quantity of rainwater, which slightly lowers the temperatures in the water bodies.

The temperature at point S2 in the rainy season is below the values established by CONAMA Resolution No. 357/2005 (Brasil, 2005) (table 1). Studies show that the appropriate temperature for the aquatic environment is important, as it can influence the development of organisms that live there in terms of their morphology, physiology and

ecology, which can bring future harm to human beings (Nascimento et al., 2020). Temperature, dissolved oxygen and the effect of contamination are closely related factors in the aquatic environment, since with an increase in temperature there is an increase in the metabolic rate of organisms, leading to greater energy expenditure, oxygen consumption and, consequently, greater sensitivity to the effects of pollutants (Gomes, 2019).

In relation to the pH parameter, the averages varied between 6.93 and 8.04, in accordance with CONAMA Resolution No. 357/2005 (Brasil, 2005), as indicated in Table 1. These results are similar to those found by Silva et al., (2020), in which the pH of water samples from oyster cultivation in the Amazon estuary in the state of Pará varied between 6.7 and 7.2.

The pH is an extremely important factor for the aquatic environment, as it influences the chemical reactions and phenomena that occur in water (Ostrensky and Boeger, 1998). When the pH is more alkaline, there is a greater loss of nitrogen to the environment (Sipaúba-Tavares, 1994), as there is a greater transformation of the ammonium ion (NH_4) into free and gaseous ammonia (NH_3), which can influence the development of aquatic biota. Variation in this parameter can cause major changes in aquatic ecosystems.

Once rates are high, it can affect the availability of food and nutrients for taxa (Silva and Oliveira, 2020). In the oyster supernatant, the pH was measured and always remained at 7.0 in both the rainy and dry periods.

Dissolved oxygen is one of the most important parameters to express the quality of water in a given aquatic environment (BRASIL, 2006), being considered a vital element for the life of fish, molluscs, plankton, bacteria and aquatic plants (Ostrensky; Boeger, 1998 ; Sipaúba-Tavares, 1994). The solubility of oxygen in water depends on different environmental factors, such as temperature, atmospheric pressure and salinity (Nascimento et al., 2020).

In this research, the salinity parameter varied between 16.1 g.Kg⁻¹ and 36.7 g.Kg⁻¹, being higher in the dry period, which may be related to the evaporation process that causes salt concentrations to increase. in saline water bodies with low renewal. A study carried out by Gomes (2019) states that this configuration presents a typical scenario of a marine environment governed by rainfall distribution, in which the lowest values are observed in the rainy season, with high precipitation. Lower salinities close to tolerance levels cause feeding to cease, and the high concentration of algae can decrease or inhibit the stimulation of filtration (Gomes, 2019).

According to the Venice System for salinity, environments are classified as follows: Aquatic environments in fresh water (salinity below 0.5); Oligohaline (from 0.5 to values

less than 5.0); Mesohaline (from 5.0 to less than 18.0); Polyhaline (from 18.0 to less than 30.0) and Eualine (salinity from 30 to 40.0) (Venice-System, 1959).

Therefore, during the period of this study, salinity maintained mesohaline, polyhaline and euhaline characteristics, which is presented by most estuarine waters in tropical regions. This parameter may be influenced by rainfall and river input, which gradually dilute the saline waters within the estuarine system (Nascimento et al., 2020).

4.2. Oyster biometric

It is likely that there are several factors that are contributing to a smaller size and total weight of oysters collected at point S2 (extraction area), demonstrating that environmental conditions (pH, salinity, temperature, dissolved oxygen) have possibly influenced the growth and in the survival of bivalve molluscs during different phases of the life cycle (Funo et al., 2015). The highest biometric values recorded for animals in the cultivation area during the dry season, both in relation to the other location and in relation to the rainy season, reflect greater energetic and metabolic stability of the organisms in the face of increased salinity (Santos et al., 2021).

In an experimental study carried out by Funo et al., (2015) on the influence of salinity on the growth and survival of oysters, it was found that the highest biometric values recorded were at a salinity of 25 g.kg⁻¹, for the height, at a salinity of 20 g.kg⁻¹, for length, salinity from 20 g.kg⁻¹ to 25 g.kg⁻¹, for width, salinity from 20 g.kg⁻¹ to 30 g.kg⁻¹ for weight. The authors also found that the best salinity range for the survival of organisms was 20 to 25 cm g.kg⁻¹. Therefore, the values recorded in areas S1, S2 and S3 are not within the range cited by the work, where salinity rates in area S1 were always above 28 g.kg⁻¹ and in areas S2 and S3 presented values below 18.2 g.kg⁻¹.

According to Noletto (2021), if the environment in which oysters are found is impacted by contaminants, their development may also be affected, despite being very tolerant organisms to certain concentrations of toxic compounds, such as pesticides, heavy metals, hydrocarbons, among others. .

It is known that oysters, like most aquatic molluscs, are osmoconforming organisms (Willmer et al., 2004; Santos et al., 2021) and, as they are typical of estuarine environments, they have a high capacity to control their cell volume (Willmer et al., 2004). However, once subjected to situations of osmotic stress, they can reduce the energy directed to growth due to the cost of survival demands (Santos et al., 2021). Funo et al., (2015) studied this phenomenon, through a series of measures and there was a decrease in the filtration rate,

which directly affects the growth of oysters (Guimarães et al., 2008).

2.3. Quantification of nitrites

According to Barbieri et al., (2014), abiotic water parameters, such as temperature, dissolved oxygen, among others, can influence the action of nitrites. pH has a direct relationship with the formation of methemoglobin, which is unable to transport oxygen to tissues and can cause hypoxia and cyanosis. As nitrite has the ability to oxidize the iron atom in hemoglobin and transform it into methemoglobin, the higher the pH of the medium, the greater the toxicity of nitrite. In this work, the pH value always maintained 7.0 in the oyster supernatant, in both periods evaluated.

In the urban area (S3) and in the cultivation area (S1), nitrite concentrations are lower, varying between 0.092 mg/L and 0.245 mg/L. To date, there is no regulation through Brazilian legislation or other works in the literature indicating minimum acceptable values of this compound for human consumption. However, we cannot rule out the possibility that other marine abnormalities are being affected, as oysters are highly resistant to toxic compounds (Barbieri et al., 2014).

When ingested, nitrate needs to be reduced into nitrite and then into nitric oxide (NO). Physiologically, NO is characterized by being a gaseous molecule, quickly oxidized to nitrite and nitrate, which can be quantified in serum and other biological fluids such as urine and homogenates of various samples, after deproteinization. NO is essential for health and there are at least 3 origins or physiological sources, the first is endogenous, NO is produced from the amino acid L-arginine and other substrates and co-factors. The second source of nitrite is obtained from nitrate present in vegetables, green leaves and tubers, in addition to some fruits, when ingested from these sources it is readily decomposed to NO and other nitrogen oxides. The third source is the intake of water and processed meat products. Studies suggest that these contribute around 5% of the total nitrate intake and vegetables contribute 80 to 87% of consumption and possibly the application of fertilizers in agricultural production results in greater absorption of nitrogen by vegetables. Drinking water in Europe has a regulated nitrate value of up to 50mg/mL and in the United States this value drops to 44mg/L, in order to prevent the occurrence of childhood methemoglobinemia (Olivo and Ribeiro, 2018).

Nitrite currently poses a danger due to a global use of sodium nitrite for recreational purposes added to aliphatic and suicide esters, showing that the old poison is in use today and poses a substantial risk to society. The cheapest and most used method to determine

nitrite in fatal poisonings in forensic medicine is the Griess method (Tusiewicz et al., 2023).

This study is innovative as it is the first time that nitrite has been quantified in oyster supernatant. This biological fluid is characterized by being translucent and protein-free, making it practical, easy to collect and efficient for environmental monitoring studies. NO can be detected using various in vitro and in vivo methods, the colorimetric method has the advantage of being highly sensitive, accurate, easy to access and economical. The Griess method was discovered in 1879, being the most common for the detection of nitrite and nitrate in vitro due to its high sensitivity, low cost and extensively used for the analysis of nitrite and nitrate (NO) in samples of saliva, urine, serum, brain fluid and culture media (Goshi et al., 2019).

According to the results obtained, it is suggested that the highest concentration of this inorganic contaminant in area S2 is due to pollution at the site, mainly due to the inadequate disposal of solid waste, since this point is located within a community.

Smith and Williams (1974) carried out an experiment with two species of fish, *Salmo gairdneri* and *Oncorhynchus tshawytscha*, which were exposed to water containing nitrite at concentrations of 0.15 and 0.55 mg/liter for 48 and 24 hours. The authors found that both respond physiologically to nitrite, producing methemoglobin, but only at a concentration of 55% did mortality occur. They also highlight that nitrite toxicity is lower in salty waters. This corroborates the results of the present study, in which areas with higher salinity levels presented lower amounts of nitrites in the oyster supernatant and in the water.

Huey et al (1980) also evaluated sub-lethal effects on juvenile channel catfish exposed to 5 mg/liter nitrite. Methemoglobin increased rapidly during the first 6 hours from 7% to 59%. None of the fish survived for more than 24 hours. But when transferred to water without nitrite they showed almost normal amounts of methemoglobin (13%) after 24 hours.

It is possible to observe that there is a scarcity of studies related to the evaluation and analysis of this compound in these animals, which was also verified by Barbieri et al., (2014), who highlighted the small number of studies in relation to nitrite toxicity in bivalve molluscs.

The only previous report in the literature on the presence of lethal and sub-lethal effects of nitrites in *Crassostrea virginica* oysters was carried out by Epifanio and Sarna (1975), who observed that this bivalve mollusc has a higher tolerance to nitrite than other aquatic animals. The average limits observed by the authors for *C. virginica* were 1.081 to 2.415 mg/L, values that are higher than those found in the present research, and may indicate that the values are within an average tolerance range in the studied cultivation area.

Our results show a higher concentration of nitrites in oysters in the extraction area (S2) (dry period 0.41 ± 0.7 mg/L and rainy period 0.28 ± 0.11 mg/L), a concentration that may be associated exposure to toxic substances present in the local water, indicating that oysters in this area are exposed to a higher concentration of pollutants. Therefore, the use of nitrite quantification demonstrates that water bodies are subject to inadequate disposal of solid waste and disposal of domestic effluents that carry potentially toxic substances, influencing the health of organisms.

5. Conclusions

We concluded that the points studied have a low value of dissolved oxygen, suggesting that the study areas have a high microbial activity resulting from the decomposition of organic matter. In relation to biometric analysis, it is possible to observe that oysters from extractivism are smaller in all dimensions, especially during the rainy season. The dry period presented statistically higher values for nitrite in the extractivism area (S2), considering this area the most impacted, suggesting greater anthropogenic contamination. In this way, it is possible to conclude that the physical-chemical analysis of water combined with biometrics and nitrite quantification are an effective, low-cost and fast tool that can be used in environmental monitoring.

Acknowledgements

We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the scholarship provided to G.S. Castro (Process Number 88887.700390/2022-00).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests

Funding

This research received funding from the PDPG Amazônia project, Capes.

References

- Barbieri, E., Marques, HLA, Bondioli, ACV, Campolim, MB, Ferrarini, AT, 2014. Concentrations of ammonia nitrogen, nitrite and nitrate in oyster fattening areas in the municipality of Cananeia-SP. *The World of Health*, São Paulo. 38(1), 105-115.
- Brazil., 2006. Ministry of the Environment. Health Surveillance Secretariat. Surveillance and

- control of water quality for human consumption. Brasília: Official Gazette of the Union.
- Colt, JE, Armstrong, DA, 1981. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish, and molluscs.
- Epifanio, CE, Srna, RF, 1975. Toxicity of ammonia, nitrite ion, nitrate ion, and orthophosphate to *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. *Marine Biol.* 33, 241-6.
- Goshi, E., Zhou, G., He, Q., 2019. Nitric oxide detection methods in vitro and in vivo. *Medical Gas Research.* 9, 192-207.
- Guimarães, IM, Antonio, IG, Peixoto, S., Olivera, A., 2008. Influence of salinity on the survival of the mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*. *Archives of Marine Sciences.* 41(1), 118–122.
- Huey, DW, Simco, B., Criswell, DW, 1980. Nitrite-induced methemoglobin formation in channel catfish. *Transactions of the American Fisheries Society.* 109, 558-562.
- Nascimento, JEF, 2020. Seasonal variation of physicochemical parameters in the estuarine portion of the municipality of Raposa – MA. *Scientific Interfaces: Health and Environment.* 8, 257-271.
- Noletto, KS, Oliveira, SRS, Lima, IMA, De Jesus, WB, Castro, JS, De Santana, TC, Cardoso, LM, Jorge, MB, Santos, DMS, Torres, JRS, Carvalho-Neta, RNF, 2021. Biochemical and Histological Biomarkers in *Crassostrea* sp. (Bivalvia, Ostreidae) for Environmental Monitoring of a Neotropical Estuarine Area (São José Bay, Northeastern Brazil). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* 106, 614-620.
- Olivo, R., Ribeiro, LGT, 2018. New concepts on nitrates and nitrites. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR.* 24, 115-125.
- Ostrensky, A., Boeger, W., 1998. *Fish farming: fundamentals and management techniques.* Guaíba: Agriculture.
- Ribeiro, IGT, Olivo, R., 2016. Egg – to eat or not to eat. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research.* 17(1): 7-13.
- Ruppert, EE, Barnes, RD, 1996. *Invertebrate Zoology.* São Paulo: Roca. 6, 412-449.
- Goshi, E., Zhou, G., He, Q., 2019. Nitric oxide detection methods in vitro and in vivo. *Medical Gas Research.* 9, 192-207.
- Guimarães, IM, Antonio, IG, Peixoto, S., Olivera, A., 2008. Influence of salinity on the survival of the mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*. *Archives of Marine Sciences.* 41(1), 118–122.
- Huey, DW, Simco, BA, Criswell, DW, 1980. Nitrite-induced methemoglobin formation in channel catfish. *Transactions of the American Fisheries Society.* 109, 558-562.
- Nascimento, JEF, 2020. Seasonal variation of physicochemical parameters in the estuarine

portion of the municipality of Raposa – MA. *Scientific Interfaces: Health and Environment*. 8, 257-271.

Ostrensky, A., Boeger, W., 1998. *Fish farming: fundamentals and management techniques*. Guaíba: Agriculture.

Santos, CCM, Costa, JFM, Santos, CRM, Amado, IL, 2019. Influence of seasonality on the natural modulation of oxidative stress biomarkers in mangrove crab *Ucides chordatus* (Brachyura, Ucridae). *Elsevier Journal*. 227, 146-153.

Santos, MEM, Ferreira, CN, 2019. Influence of environmental variables on the benthic macrofauna of sandy beaches. *Science and Nature*. 41, 5.

Santos, CCM, Ferreira, JÁ, Santos, CRM, Amado, IL, 2021. Seasonal modulation of oxidative stress biomarkers in mangrove oyster (*Crassostea gasar*) from the Amazon estuary. *Elsevier Journal*. 257, 1-9.

Silva, JDS, Rocha, IKBS, Freitas, IC, Pereira, NJ, Carvalho-Neta, RNF, 2015. Bioethical principles applied to aquatic ecotoxicological studies. *Bioethics*. 23, 409-418.

Sipaúba-Tavares, IH, 1994. *Limnology applied to aquaculture*.

Smith, CE, Williams WG, 1974. Experimental Nitrite Toxicity in Rainbow Trout and Chinook Salmon. *Trans Am Fish Soc*. 103, 389-90.

Tusiewicz, K., Kuropka, P., Workiewicz, E., Wachelko, O., Szpot, P., Zawadzki, M., 2023. Nitrites: An Old Poison or a Current Hazard? *Epidemiology of Intoxications Covering the Last 100 Years and Evaluation of Analytical Methods*. *Toxics*. 11, 1-21.

Venice-System., 1959. Final resolution of the symposium on the classification of Brackish Waters. *Archive of Oceanography Limnology*. 11, 243-248.

Willmer, P., Stone, G., Johnston, I., 2004. *Environmental Physiology of Animals*. Blackwell, Oxford, England.