



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
AQUICULTURA**

Avaliação da presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e caracterização das populações bacterianas de *Anomalocardia brasiliana* e *Crassostrea rhizophorae* em estuários de Pernambuco após derramamento de óleo

Gisely Karla de Almeida Costa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título de Mestre.

**Prof.^ª Dr.^ª. Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva
Orientadora**

**Recife,
Agosto/2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C838a Costa, Gisely Karla de Almeida
Avaliação da presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e caracterização das populações bacterianas de *Anomalocardia brasiliana* e *Crassostrea rhizophorae* em estuários de Pernambuco após derramamento de óleo / Gisely Karla de Almeida Costa. - 2022.
47 f. : il.
- Orientador: Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva.
Inclui referências.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, Recife, 2022.
1. HPA. 2. Segurança alimentar. 3. Molusco. 4. Atlântico Sul Tropical. I. Silva, Suzianny Maria Bezerra Cabral da, orient. II. Título

CDD 639.3

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
AQUICULTURA

Avaliação da presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e caracterização das populações bacterianas de *Anomalocardia brasiliiana* e *Crassostrea rhizophorae* em estuários de Pernambuco após derramamento de óleo

Gisely Karla de Almeida Costa

Dissertação julgada adequada para obtenção do título de mestre/doutor em Recursos Pesqueiros e Aquicultura. Defendida e aprovada em 28/09/2022 pela seguinte Banca Examinadora.

Prof.^a Dr.^a Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva (Orientadora)
Departamento de Pesca e Aquicultura/Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Gelcirene de Albuquerque Costa (Membro externo)
Departamento de Pesca e Aquicultura/Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Juliana Ferreira dos Santos (Membro interno)
Departamento de Pesca e Aquicultura/Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedicatória

À minha família, e a todos que
doaram o seu tempo e trabalho
para a conclusão deste projeto.

Agradecimentos

À Deus, que iluminou o meu caminho, possibilitando que os obstáculos fossem superados.

À minha família, pelo apoio, força e incentivo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida durante a pós-graduação.

À minha orientadora, Professora Dra. Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva, que sem o apoio, nada teria sido possível. Serei eternamente grata pela orientação, paciência, dedicação, e pelos aprendizados acadêmico, pessoal e profissional.

Ao Professor Dr. Luís Otavio Brito da Silva, que por grande parte do mestrado me coorientou.

Ao Professor Dr. Fernando Leandro dos Santos e Professor Dr. Renato S. Carreira, pela contribuição nas análises.

À Professora Dra. Maria Raquel Moura Coimbra, e a equipe do Laboratório de Genética Aplicada por ceder o espaço e os equipamentos sempre que necessário.

À equipe do Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos, pelo apoio e ajuda durante o desenvolvimento deste estudo, em especial: Paloma Alves, Katharine Souza, Igor Felix, Gabriel Michereff, Maria Eduarda Mendonça, Islaine Lemos, Raissa Trindade e Sergio Caldas a vocês, um imenso obrigada!

À Genison Silva e Marilia Espindola que mesmo sendo alheios ao projeto contribuíram enormemente, obrigada por tudo.

À Wilka Granjeiro que apesar do cansaço e dificuldades me deu o apoio e incentivo que precisei nessa extensa caminhada.

Aos professores, que contribuíram para a minha formação durante esse período, e aos funcionários do Departamento de Pesca e Aquicultura da UFRPE.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho e/ou se fizeram presentes durante este período.

Resumo

O presente estudo foi dividido em duas partes, a primeira objetivou a analisar a concentração de HPAs e avaliar histologicamente as brânquias dos animais coletados. E, a segunda, avaliar a presença e caracterizar as populações bacterianas dos mariscos e ostras, ambos nos estuários do Estado de Pernambuco após o derramamento de óleo. Para isso, foram coletadas amostras de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) e mariscos (*Anomalocardia brasiliiana*), em pontos do litoral norte e sul do estado. Os tecidos moles dos animais coletados foram analisados quanto as concentrações totais dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), e as brânquias foram analisadas histologicamente. Para a segunda análise, foram quantificados as contagens total de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas, *Staphylococcus aureus* coagulase positivo e determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes seguindo as orientações analíticas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Além disso, foram caracterizadas por sequenciamento (usando primers universais de regiões codificadoras do gene 16S rRNA) isolados bacterianos obtidos nos diferentes pontos analisados visando a identificação das espécies de bactérias presentes no ambiente. Para o primeiro estudo, foram observadas concentrações de HPAs diferentes entre os litorais, sendo evidenciado principalmente, pela concentração total nos mariscos do litoral norte, que em média obteve 4 vezes maior concentração quando comparado ao litoral sul, com os compostos de baixo peso molecular, naftaleno e antraceno, sendo os principais representantes para a concentração total. Decorrente da exposição a esses compostos, foram observadas alterações histológicas nas brânquias dos bivalves, sendo mais severo nos espécimes amostrados nos pontos do litoral norte. Para as análises bacteriológicas, foi observada que as contagens das bactérias mesófilas e psicotróficas de ambas as espécies em relação aos pontos de coleta permaneceram abaixo do limiar adotado para segurança alimentar. Para o gênero *Staphylococcus*, os resultados obtidos estão de acordo com a legislação Brasileira vigente não sendo encontrados *Staphylococcus* coagulase-positivo. Para as contagens de coliformes totais e termotolerantes, a maior média foi observada entre os mariscos e as ostras do litoral norte, não sendo identificados nas amostras coliformes termotolerantes. Com isso, foi possível concluir que, no ponto de vista de consumo humano, ambas espécies de ambos os litorais, estão aptas para consumo, segundo a legislação brasileira, porém a persistência dos resíduos dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no ambiente causou alterações nos tecidos branquiais dos bivalves, com ênfase para os espécimes amostrados no litoral norte, demonstrando uma alteração no estado de saúde dos animais.

Palavras-chave: HPA, Segurança alimentar, Molusco, Atlântico Sul Tropical.

Abstract

The present study was divided into two parts, the first aimed to analyze the concentration of PAHs and histologically evaluate the gills of the collected animals. And the second is to evaluate the presence and characterize the bacterial populations of shellfish and oysters, both in the estuaries of the State of Pernambuco after the oil spill. For this, samples of oysters (*C. rhizophorae*) and shellfish (*A. brasiliiana*) were collected from locations on the northern and southern coasts of the state. The wet tissues of the animals were analyzed for total concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), and the gills were analyzed histologically. For the second analysis, total counts of mesophilic aerobic and psychrotrophic bacteria, coagulase-positive *Staphylococcus aureus*, and determination of the Most Probable Number (MPN) of total and thermotolerant coliforms were quantified following the analytical guidelines of the “Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento” (MAPA). In addition, bacterial isolates obtained from the different points analyzed were characterized by sequencing (using universal primers from coding regions of the 16S rRNA gene) to identify the bacterial species present in the environment. In the first study, different PAHs concentrations were observed along the coast, being evidenced mainly by the total concentration in the shellfish from the north coast, which averaged four times higher compared to the south coast. The low molecular weight compounds naphthalene and anthracene were the representatives of the total concentration. As a result of exposure to these compounds, histological changes were observed in the gills of the bivalves, being more severe in the specimens sampled at the northern coast points. For the bacteriological analyses, it was observed that the mesophilic and psychrotrophic bacteria counts of both species concerning the analyzed locations remained below the threshold adopted for food safety. For the genus *Staphylococcus*, the results obtained are under the current Brazilian legislation, with no presence of coagulase-positive *Staphylococcus*. For total and thermotolerant coliform, the highest average was observed among the shellfish and oysters from the northern coast, with no thermotolerant coliforms identified in the samples. With this, it was possible to conclude that, for human consumption, both species are safe for eating, according to Brazilian legislation. But the persistence of polycyclic aromatic hydrocarbon residues in the environment caused alterations in the gill tissues of the bivalves, with emphasis on the specimens sampled from the northern coast, demonstrating an alteration in the health of the animals.

Key words: HPA, Food safety, Shellfish, Tropical South Atlantic.

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Pontos de coleta nos Litorais Norte e Sul de Pernambuco (Brasil).	18
Figura 2. Concentração total de HPAs (média \pm desvio padrão) nas espécies de bivalves amostrados na costa de Pernambuco, expressas em ng.g^{-1} de peso úmido.	20
Figura 3. Estruturas das lamelas branquiais de ostras e mariscos coletados no litoral pernambucano (A) Lamelas de <i>A. brasiliana</i> coletadas no litoral sul, (B) Lamelas de <i>A. brasiliana</i> coletadas no litoral norte, (C) Lamelas de <i>C. rhizophorae</i> coletadas no litoral sul, (D) Lamelas de <i>C. rhizophorae</i> coletadas no litoral norte.	24
Figura 4. Pontos de coleta nos Litorais Norte e Sul de Pernambuco (Brasil)	33
Figura 5. Abundância relativa da composição da comunidade bacteriana de <i>A. brasiliana</i> e <i>C. rhizophorae</i>	37

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1. Concentração média e desvio padrão de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em espécimes de <i>A. brasiliana</i> e <i>C. rhizophorae</i> coletadas na costa de Pernambuco, expressas em $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso úmido.....	22
Tabela 2. Percentual de estruturas branquiais não integras de <i>A. brasiliana</i> e <i>C. rhizophorae</i> coletadas no litoral pernambucano.	24
Tabela 3. Sequências de dos primers das regiões codificadoras do gene 16S.....	34
Tabela 4. Contagem bacteriana das mesófilas, psicotrófica e do gênero <i>Staphylococcus</i> nos diferentes pontos de coleta.	35
Tabela 5. Contagem de coliformes totais nos diferentes pontos de coleta.	36

Sumário

Página

Dedicatória.....	4
Agradecimentos	5
Resumo	6
Abstract.....	7
Lista de figuras	8
Lista de tabelas	9
1 Introdução.....	11
1.1 Objetivo geral	14
1.2 Objetivos específicos	14
2 Artigo Científico	15
2.1 Artigo 1 - Avaliação da presença de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) e alterações histológicas em <i>Anomalocardia brasiliana</i> e <i>Crassostrea rhizophorae</i> de Pernambuco após derramamento de óleo	15
2.2 Artigo 2 - Avaliação e caracterização das populações bacterianas de <i>Anomalocardia brasiliana</i> e <i>Crassostrea rhizophorae</i> em estuários de Pernambuco após derramamento de óleo. 30	
3 Considerações finais.....	42
4 Referências	43

1 Introdução

Em 2019, a costa do nordeste brasileiro sofreu o maior desastre ambiental da sua história, causado por um derramamento de óleo, na bacia do Oceano Atlântico Sul e nas regiões costeiras tropicais do mundo (SOARES *et al.*, 2020). O vazamento se estendeu por mais de 3.000 km da costa nordeste e parte da costa sudeste, atingindo em torno de 800 localidades (MAGALHÃES *et al.*, 2021; MARINHA DO BRASIL, 2019), sendo registradas grandes ocorrências entre agosto de 2019 e janeiro de 2020, e pequenas reincidências desde então (MÜLLER *et al.*, 2021).

Estudos da marinha e da Petróleo Brasileiro S.A. Petrobrás (Petrobrás) quanto a composição do material o determinou como petróleo (GOVERNO DO BRASIL, 2019), tornando o evento como o mais extenso derramamento de petróleo nas regiões marinhas tropicais (MÜLLER *et al.*, 2021). Pesquisas indicaram que o óleo encontrado ao longo de toda a costa tinha a mesma origem, devido a suas características, sendo um material sólido, com densidade superior a água do mar e com formação de emulsão estável a partir de processos meteorológicos (ARAÚJO *et al.*, 2021; LOURENÇO *et al.*, 2020), sendo postulado que a localização mais provável do derramamento foi a aproximadamente 700 km da costa (LESSA *et al.*, 2021).

Até atingir o litoral brasileiro, o óleo sofreu diversos processos como evaporação, dissolução, biodegradação e foto-oxidação, que modificaram sua forma e composição. Embora o intemperismo sofrido aumente a eficácia da sua dispersão, também é aumentada a persistência de frações do óleo bruto solúvel na coluna d'água (KUJAWINSKI *et al.*, 2011; REDDY *et al.*, 2012).

O petróleo bruto é uma complexa combinação que contém uma multiplicidade de toxinas, com aproximadamente 17.000 compostos orgânicos com volatilidade, solubilidade e toxicidade diferentes (ALLAN; SMITH; ANDERSON, 2012). Tais compostos são formados unicamente por carbono e hidrogênio, conhecidos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que geralmente são introduzidos no ambiente marinho por vários processos, como a combustão de matéria orgânica, maturação da matéria orgânica sob o gradiente geotérmico (hidrocarbonetos de petróleo) e a degradação a curto prazo dos precursores biogênicos (BAUMARD *et al.*, 1998).

A maioria das entradas de HPAs no ambiente marinho estão ligados à atividade humana, no caso dos compostos presentes no petróleo, após dissipar, emulsionam, tornando as gotículas de óleo incapazes de re-coalescer, aumentando-se a probabilidade de interações das microgotas com organismos planctônicos ou organismos sésseis que se alimentam de pequenas partículas,

como os moluscos bivalves (GRAHAM *et al.*, 2010), razão pela qual, estes organismos são amplamente adotados em estudos ecotoxicológicos (CANESI *et al.*, 2012).

Os bivalves, por serem animais filtradores, possuem a capacidade de acumular diferentes tipos de substâncias do meio ambiente (STREHSE; MASER, 2020), com relatos de espécies que acumulam HPAs solubilizados em água através de suas brânquias, ou pela ingestão da fração granulométrica fina (<62 µm) do sedimento e a posterior absorção pelo trato digestivo (OROS; ROSS, 2005). Além disso, estes organismos são especialmente susceptíveis a poluentes transportados pela água, sendo também, capazes de bioacumular contaminação bacteriana e de poluição orgânica (HELMHOLZ *et al.*, 2016; PINTO, 2012).

No caso dos HPAs, a acumulação se dá através da bioacumulação e biomagnificação, o que causa riscos à saúde humana (WANG *et al.*, 2015), enquanto para a contaminação orgânica (bactérias e demais poluentes orgânicos), a concentração ocorre principalmente pela característica filtradora com seletividade para pequenas partículas, como o fitoplâncton, zooplâncton, vírus, bactérias e matéria inorgânica presentes no ambiente (OLIVEIRA *et al.*, 2011a).

Análises feitas pouco tempo após o acidente (outubro de 2019 a janeiro de 2020) mostraram níveis consideráveis de metais como mercúrio (Hg), arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), e zinco (Zn) na água do mar, e HPAs como: naftaleno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno e acenaftaleno na água do mar, peixes e mariscos (bivalves), em níveis acima dos recomendados na resolução brasileira para consumo destes organismos (SOARES *et al.*, 2021).

A toxicidade mais preocupante dos HPAs é sua carcinogenicidade, pois devido à sua hidrofobicidade, são transportados para dentro das células, levando à indução da expressão gênica do grupo enzimático do citocromo, no qual são metabolizados com possibilidade de ligação ao DNA, tornando-se mutagênicos/carcinogênicos (HONDA e SUZUKI, 2020). Por esta característica, os HPAs são considerados poluentes altamente tóxicos com capacidade de desregular o sistema endócrino, além de sua fácil disseminação no ambiente, perpetuação e bioacumulação (GARCIA *et al.*, 2014).

Os riscos toxicológicos envolvidos são graves, agudos e crônicos, decorrente das frações tóxicas do petróleo associadas a compostos aromáticos que podem culminar com a morte após a exposição, que por sua vez, pode ocorrer por ingestão, absorção por meio da pele íntegra e inalação (PENA *et al.*, 2020). Dezesete HPAs foram listados como mais graves em uma possível relação de exposição e efeitos adversos a saúde humana, por apresentarem efeitos, citotóxicos, genotóxicos/mutagênicos e carcinogenicidade (WHO, 1998). Sendo benzo[a]

pireno, naftaleno, criseno, benz[a]antraceno, benzo[k] fluoranteno e benzo[b]fluoranteno alguns dos pertencentes a esta lista (MALLAH *et al.*, 2022).

Similarmente, para a biota marinha, há estudos atestando alterações sobre vários processos fisiológicos das espécies de peixes e invertebrados, representando uma grande ameaça potencial aos ecossistemas marinhos (HONDA; SUZUKI, 2020; SUZUKI *et al.*, 2018), sendo demonstrado que a exposição a alguns HPAs pode resultar em falha na fertilização (JEONG; CHO, 2005), danos oxidativos (PITTURA *et al.*, 2018; YAZDANI, 2020) e genotoxicidade (SARKER *et al.*, 2018).

Além de contaminantes inorgânicos, bivalves tem a capacidade de acumular diferentes microrganismos (PARK *et al.*, 2018), tornando-os importantes transmissores de patógenos (CAMPOS *et al.*, 2017), assim, a qualidade microbiana dos moluscos muitas vezes se correlaciona significativamente com a população humana e usos da terra em corpos d'água adjacentes (VAN DOLAH *et al.*, 2008). Neste sentido, coliformes fecais são indicadores aplicados comumente para a avaliação da qualidade dos moluscos e são usados avaliar a características das águas onde os moluscos são capturados (GYAWALI; HEWITT, 2020; HOOD; NESS; BLAKE, 1983; OLIVEIRA *et al.*, 2011b).

Nacionalmente, os padrões microbiológicos de qualidade alimentar são regulados pela Resolução do Conselho Nacional de Saúde da Agência de Vigilância, Resolução RDC nº 12/01 da ANVISA, no qual estão previstas as análises e limites máximos aceitáveis para *Escherichia coli* (bactéria predominante do grupo de coliformes termotolerantes), *Staphylococcus coagulase positiva* e *Salmonella sp.* em produtos alimentares, incluindo o pescado (ANVISA, 2001). Em todo o mundo, existe vários registros de doenças associadas ao consumo de bivalves devido a microrganismos ou biotoxinas (POTASMAN; PAZ; ODEH, 2002).

Dentre as espécies avaliadas durante e após os episódios do derramamento de óleo (MAGALHÃES *et al.*, 2022; SOARES *et al.*, 2021, 2020), destacam-se os bivalves *Anomalocardia brasiliana*, e *Crassostrea rhizophorae*, por serem espécies amplamente exploradas nos estuários ao longo da costa brasileira (FERREIRA; DUARTE; SILVA, 2019), tornando-as relevante a estudos que utilizem de monitoramento dos níveis locais de contaminação por HPAs e grupos bacterianos patogênicos à saúde pública.

1.1 Objetivo geral

Avaliar a presença de HPAs e caracterizar as populações bacterianas de *Anomalocardia brasiliiana* e *Crassostrea rhizophorae* nos estuários do Estado de Pernambuco após o derramamento de óleo.

1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a concentração de HPAs nas amostras de *Anomalocardia brasiliiana* e *Crassostrea rhizophorae* coletadas nos litorais norte e sul do estado de Pernambuco, após o derramamento de óleo;
- Avaliar respostas histopatológicas em brânquias de *Anomalocardia brasiliiana* e *Crassostrea rhizophorae* coletadas nos litorais norte e sul do estado de Pernambuco, após o derramamento de óleo;
- Determinar a contagem de grupos bacterianos patogênicos à saúde pública: contagem total de bactérias aeróbias mesófilas (CTB), de *Staphylococcus* coagulase positiva, do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes e de bactérias psicrótróficas em amostras de *A. brasiliiana* e *C. rhizophorae* nos litorais norte e sul do estado de Pernambuco;
- Identificar molecularmente as bactérias isoladas das amostras de *A. brasiliiana* e *C. rhizophorae* coletadas nos litorais norte e sul do estado de Pernambuco.

2 Artigo Científico

Os resultados obtidos durante o trabalho experimental desta dissertação estão apresentados nos artigos intitulados “**Avaliação da presença de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) e alterações histológicas em *Anomalocardia brasiliana* e *Crassostrea rhizophorae* de Pernambuco após derramamento de óleo**” e “**Avaliação e caracterização das populações bacterianas de *Anomalocardia brasiliana* e *Crassostrea rhizophorae* em estuários de Pernambuco após derramamento de óleo.**”

2.1 Artigo 1 - Avaliação da presença de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) e alterações histológicas em *Anomalocardia brasiliana* e *Crassostrea rhizophorae* de Pernambuco após derramamento de óleo

Artigo científico a ser encaminhado a Revista - Marine Pollution Bulletin.
Todas as normas de redação e citação, deste capítulo, atendem as estabelecidas pela referida revista (<https://www.sciencedirect.com/journal/marine-pollution-bulletin>)

Avaliação da presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e alterações histológicas em *Anomalocardia brasiliana* e *Crassostrea rhizophorae* de Pernambuco após derramamento de óleo

Resumo

O presente estudo objetivou analisar as concentrações dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) nas populações dos mariscos *Anomalocardia brasiliana* e ostras *Crassostrea rhizophorae* três anos após o derramamento de óleo de 2019, assim como a avaliação histopatológica dos tecidos branquiais das populações alvo. Foram amostrados indivíduos de ambas as espécies (n = 60) em pontos do litoral norte e sul do estado de Pernambuco. Foi constatada a permanência dos resíduos do óleo, sendo evidenciado principalmente pela concentração total dos HPAs nos mariscos do litoral norte, que em obteve média 4 vezes maior comparação com o sul. Dentre os HPAs analisados, os compostos de baixo peso molecular naftaleno e antraceno, foram os principais contribuintes para a concentração total. A exposição a esses compostos, provocou alterações histológicas nas brânquias dos bivalves, sendo mais severo nos espécimes amostrados no litoral norte. Demonstrando uma alteração a saúde dos bivalves, principalmente no litoral norte do estado.

Palavras-chave: Bivalve, Animal Aquático, Contaminação, Histopatologia.

Introdução

Em 2019, o nordeste brasileiro foi acometido pelo que foi considerado o mais extenso e grave desastre ambiental já registrado na história do país, causado por um derramamento de óleo que se estendeu por mais de 3.000 km da costa nordeste e parte da costa sudeste (MAGALHÃES et al., 2021; MÜLLER et al., 2021; SOARES et al., 2020). Este desastre afetou mais de 40 áreas marinhas protegidas e ecossistemas ameaçados, como mangues, recifes de corais, estuários e praias arenosas (BRUM; CAMPOS-SILVA; OLIVEIRA, 2020).

Pesquisas indicaram que o óleo encontrado na costa, determinado como petróleo bruto, apresentava característica sólida, com densidade superior a água do mar e com formação de emulsão estável a partir de processos meteorológicos (ARAÚJO et al., 2021; LOURENÇO et al., 2020; GOVERNO DO BRASIL, 2019). Tais processos possibilitaram a modificação da forma e composição do óleo facilitando a sua dissolução. Proporcionalmente, a fração de compostos de óleo bruto dissolvidos em comparação com a sua massa total é relativamente pequena, porém é facilmente dispersa (MÜLLER et al., 2021).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), compostos formados unicamente por carbono e hidrogênio e estão entre os componentes altamente tóxicos liberados pelo petróleo bruto (Gao et al., 2019). Quimicamente estáveis podem resistir à degradação quando alocados em sedimentos e são considerados poluentes altamente tóxicos com propriedades, que podem causar efeitos adversos sobre as funções fisiológicas devido a sua alta toxicidade, resultando em alta mortalidade de organismos aquáticos devido a suas propriedades genotóxicas, cancerígenas e/ou mutagênicas (GARCIA et al., 2014;).

Análises feitas meses após o acidente atestam a presença de HPAs como: naftaleno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno e acenaftaleno na água do mar, peixes e moluscos (bivalve), em níveis acima dos recomendados na resolução brasileira (MAGALHÃES et al., 2022; SOARES et al., 2021). Neste cenário, moluscos bivalves são especialmente susceptíveis aos poluentes presentes na água (HELMHOLZ et al., 2016; PINTO, 2012), pois devido a sua característica filtradora, possuem a capacidade de acumular diferentes tipos de substâncias do meio ambiente (STREHSE; MASER, 2020), havendo relatos de considerável bioacumulação de HPAs em bivalves coletados em áreas afetadas por óleo (MARTINS et al., 2013; OROS; ROSS, 2005).

Neste sentido, esses moluscos têm sido amplamente adotados em estudos ecotoxicológicos (CANESI et al., 2012) e uma das formas utilizadas para avaliação da presença de poluentes em um corpo hídrico, tem sido a análise das brânquias dos animais, que constituem uma interface primária entre o animal e o ambiente para a absorção de contaminantes (JOSHY et al., 2022). Em Pernambuco, os mariscos *Anomalocardia brasiliiana* e a ostra *Crassostrea rhizophorae* são as espécies marinhas mais exploradas comercialmente e consumidas na costa (BOEHS et al., 2010; ZEIDAN; LUZ; BOEHS, 2012) tornando-as relevante a estudos que monitorem os níveis de contaminação por HPAs e suas consequências.

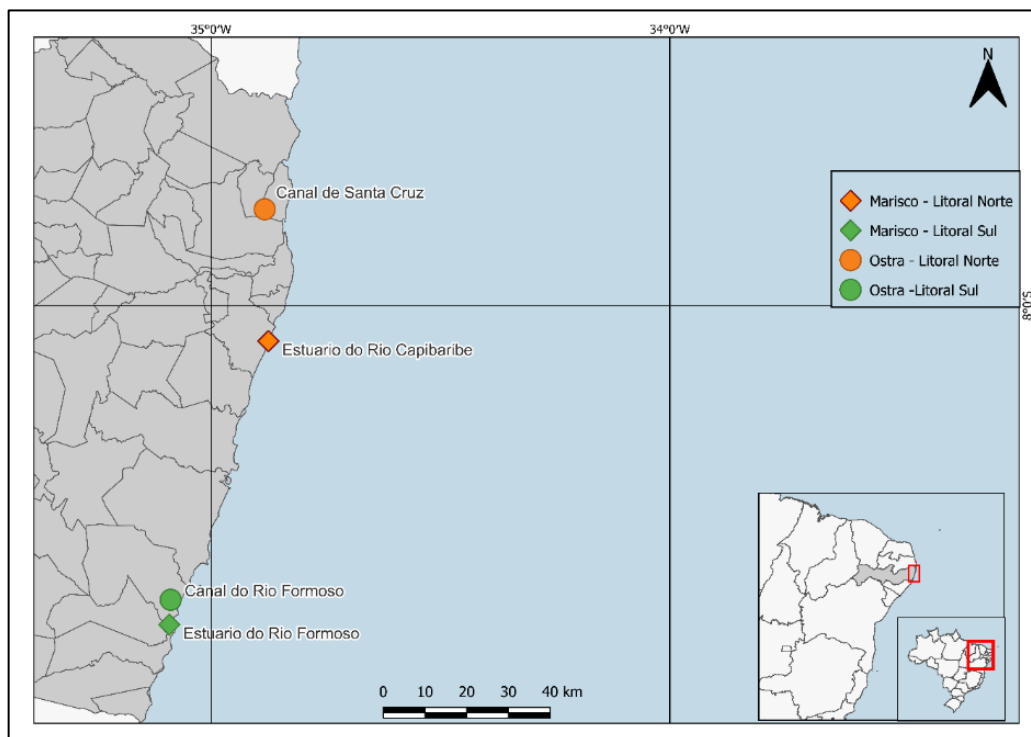
Material e métodos

Coleta e acondicionamento das amostras

Foram coletadas amostras de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) e mariscos (*Anomalocardia brasiliiana*), medindo respectivamente entre $5,52 \pm 0,67$ mm e $2,70 \pm 0,20$ mm, nos Litorais Norte (LN) e Sul (LS) de Pernambuco entre os meses de março e junho de 2022. As coletas dos mariscos foram realizadas no estuário do rio Capibaribe (Recife – PE, Litoral Norte) e do Rio Formoso (Rio Formoso – PE, Litoral Sul), e das ostras nos estuários do Canal de Santa Cruz (Itapissuma- PE, Litoral Norte) e do Rio Formoso (Rio Formoso – PE, Litoral

Sul) Figura 1. Pontos de coleta nos Litorais Norte e Sul de Pernambuco (Brasil).Figura 1). Estes locais foram determinados com base nos locais usados para a coleta de moluscos bivalves pelo comitê de crise do derramamento de óleo em Pernambuco (UFRPE, 2020).

Figura 1. Pontos de coleta nos Litorais Norte e Sul de Pernambuco (Brasil).



Imediatamente após a retirada do ambiente, os animais foram acondicionados em embalagens de alumínio (previamente mufladas a 450°C por 4 horas) lacradas e mantidas em gelo gel em caixas isotérmicas, à temperatura entre 4 e 10 °C. Para a determinação dos HPAs, foram coletadas 5 amostras por ponto. Para a análise histológica foram coletados 15 animais de cada ponto. As amostras foram processadas dentro do limite de 24 horas para que fosse mantida a integridade das mesmas.

Análise do Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)

As amostras coletadas, cada uma contendo 12 animais com um peso mole médio de $1,06 \pm 0,05$ e $2,20 \pm 0,82$ para mariscos e ostras respectivamente, foram homogeneizadas em solução salina peptonada 0,1%. Alíquotas do tecido (1,0g) foram extraídas com líquido pressurizado utilizado o equipamento ASE 300 (Thermo Scientific, Bremen, Germany), com pressão de extração foi 1500 psi e temperaturas de 80°C. Em cada amostra foi adicionado com 100 ng do padrão subrogado (p-terphenyl-D₁₄ - AccuStandard) para controle da fração de hidrocarbonetos aromáticos, os solventes utilizados foram diclorometano LiChrosolv® e metanol LiChrosolv®, do fabricante Merck. A montagem das células de volume 60 ml foi feita

com 5 g de sílica gel na base, amostra de tecido e preenchida com terra diatomácea, intercalando cada camada com filtros de celulose.

Após extração, os extratos foram concentrados e submetidos a fracionamento por cromatografia líquida em coluna de vidro (1,3 cm de diâmetro interno e 30 cm de altura) empacotada com Na₂SO₄ anidro, 7 g de alumina desativada a 2% e 10 g de sílica desativada a 5%. A coluna foi eluída com 50 mL de hexano para a retirada dos hidrocarbonetos alifáticos e, posteriormente, foi obtida a fração de aromáticos pela eluição de 75 mL de mistura diclorometano:hexano (1:1). O extrato aromático foi concentrado a 1 mL em evaporador de amostras e fluxo de N₂. Foi adicionado como padrão interno (100 ng) a mistura de HPA deuterados, contendo: (i) naftaleno-d8, (ii) acenafteno-d10, (iii) fenantreno-d10, (iv) criseno-d12 e; (v) perileno-d12 (Internal Standard, AccuStandard).

A quantificação de HPAs foi realizada por cromatografia a gás (Thermo Trace-GC) acoplado a espectrômetro de massas (Thermo ISQ), baseada no método da US-EPA 8270-D (EPA, 2014). Foi utilizada uma curva de calibração com base na adição de padrão interno (100 ng) e 10 níveis de concentração (1, 2, 5, 10, 20,50, 100, 200, 400 and 1000 ng mL⁻¹) dos 16 HPAs prioritários (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3- c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), como estabelecido pela “United States Environmental Protection Agency” (US-EPA,2007).

Análise Histopatológica

Para a realização da análise histopatológica, 15 animais de cada ponto tiveram suas brânquias retiradas cuidadosamente com bisturi. As brânquias foram imersas em solução fixadora Davidson AFA por 70 horas e, em seguida, transferidas para etanol a 70%, para sua preservação definitiva, e posterior preparo das lâminas histológicas, coradas em hematoxilina e eosina (HE) seguindo os protocolos de Bell e Lightner (1988).

Análise estatística

Os dados amostrados foram previamente analisados quanto à homogeneidade e normalidade pelos testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Para a análise estatística, visando a comparação entre os pontos de coleta foi utilizada o teste U de Mann-Whitney (ZAR, 2013). Todos os dados foram analisados com o auxílio do software IBM SPSS Statistics versão 25.0.0.0.

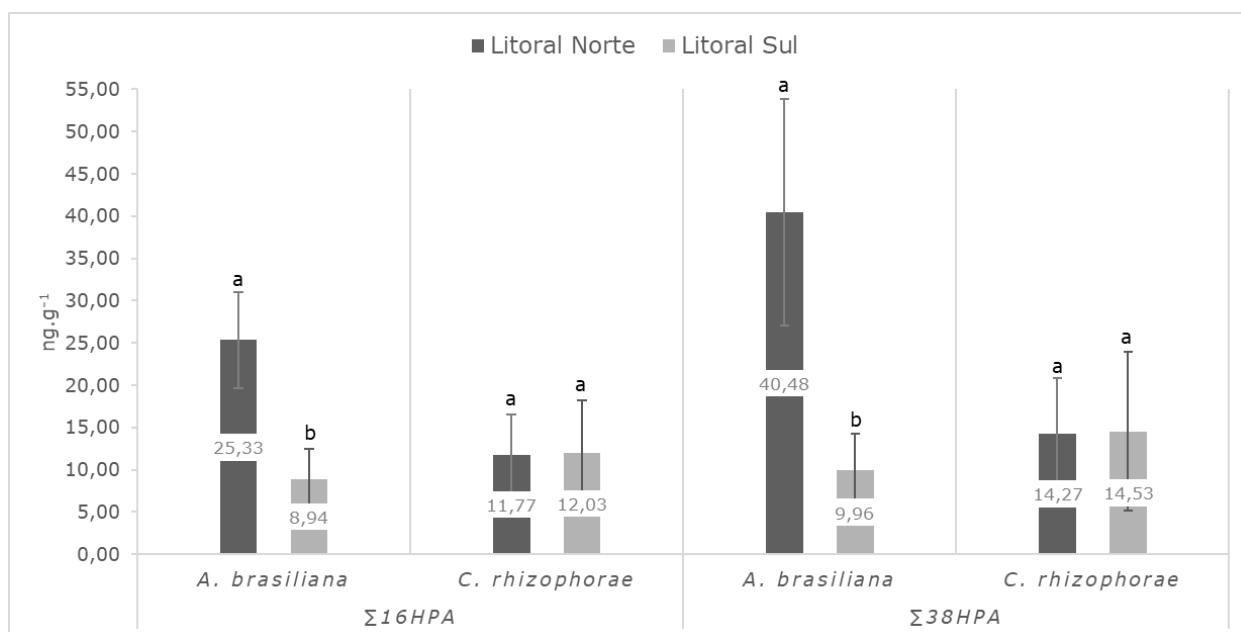
Resultados e discussão

A presença dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) foi positiva nos diferentes pontos de coleta analisados. Os HPAs totais ($\Sigma 38\text{HPA}$ - soma de 38 compostos parentais e alquilados) obtiveram diferença significativa para a espécie *A. brasiliana*, apresentando valor médio 4 vezes maior no litoral norte em comparação com o sul, não sendo detectada diferença estatística para *C. rhizophorae*, em ambos os litorais.

Similarmente, para a soma dos 16 HPAs prioritários ($\Sigma 16\text{HPA}$), foi determinado um valor médio maior nos mariscos do litoral norte (

Figura 2), que obteve mais que o dobro da concentração encontrada no litoral sul. Para a ostra *C. rhizophorae* não foi encontrada diferença entre os pontos de coleta.

Figura 2. Concentração total de HPAs (média \pm desvio padrão) nas espécies de bivalves amostrados na costa de Pernambuco, expressas em $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso úmido.



¹Letras diferentes mostram diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Embora não existam dados locais sobre a contaminação por HPAs que antecedam o derramamento de óleo de 2019, em estudo com amostragem feita entre novembro de 2019 e janeiro de 2020, Magalhães et al. (2022) reportaram valores médios de $\Sigma 37\text{HPA}$ (soma de 37 compostos parentais e alquilados) para o litoral norte e sul de Pernambuco, para ostras (*C. rhizophorae*) de 50,0 e 194,89 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ e, para mariscos (*A. brasiliana*), 172,09 e 141,25 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ respectivamente. Ainda neste mesmo estudo, para a $\Sigma 16\text{HPA}$ foi encontrado nas ostras 29,89 e

25,08 ng.g⁻¹ e, nos mariscos, 38,32 ng.g⁻¹ e 40,48 ng.g⁻¹, nos litorais norte e sul, respectivamente.

Comparando os resultados com os encontrados no presente estudo, é possível observar uma diminuição nos valores médios das concentrações de HPA, expressa em ambos os índices. Thompson et al. (2017), em uma análise das concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em bivalves de uma baía canadense, reportou níveis elevados de contaminação e toxicidade após derramamentos de diesel que voltaram aos níveis basais cinco meses após cada acidente. Na costa pernambucana (Brasil), devido à ausência de estudos prévios ao acidente ambiental ocorrido em 2019, não se faz possível tal inferência, embora tenha sido constatada a diminuição das concentrações de HPAs no presente estudo, passados dois anos do estudo feito por Magalhães et al. (2022).

O destino ambiental dos HPAs nos cenários de mudança de concentrações presentes no ambiente é importante, tendo que eles são a maior classe de carcinógenos químicos conhecidos atualmente. Os possíveis destinos para os compostos incluem volatilização, oxidação, bioacumulação, lixiviação, degradação microbiana, adsorção a partículas do solo (KÄSTNER, 2008). Em meio aquoso, uma quantidade significativa dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos é biodegradável (KADRI *et al.*, 2017), porém, os compostos de mais de três anéis aromáticos são altamente hidrófobos e tendem a se ligar à matéria orgânica depositando-se nos sedimentos (GALLEGO BLANCO, 2012).

Zhang et al. (2009), em uma análise de resíduos de HPA nos sedimentos e moluscos em áreas costeiras marítimas no norte da China, relata concentrações ($\Sigma 10\text{HPA}$) mais elevadas no sedimento que nos tecidos dos moluscos analisados. O presente estudo apenas relata a mudança das concentrações nos tecidos dos bivalves, porém, devido à alta probabilidade de alocação dos resíduos em outros organismos e no sedimento do assoalho costeiro, faz-se necessário análises que monitorem a médio e longo prazo, as concentrações residuais presentes no ambiente.

As agências estadunidenses, "*Food and Drug Administration*" (FDA) e a "*National Oceanic and Atmospheric Administration*" (NOAA) possuem um protocolo especializado para avaliação de frutos do mar para consumo humano após um derramamento de óleo. Neste protocolo os HPAs são divididos em duas categorias, não cancerígenos, que inclui naftaleno, fluoreno, antraceno, fenantreno, fluoranteno, pireno, e seus respectivos homólogos alquilados, e, cancerígenos, compostos por benz[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenz[a,h]antraceno, e indeno[1,2,3-cd]pireno (NOAA-FDA, 2010). Na perspectiva de saúde animal, Martins et al. (2013) em um estudo dos danos no DNA e efeitos oxidativos dos HPAs em brânquias de bivalves, revelou que mesmo os HPAs

considerados não cancerígenos para os humanos possuem um risco pró-mutagênico para os moluscos.

No presente estudo, para o marisco *A. brasiliiana*, as concentrações encontradas de todos os HPAs analisados no litoral norte foram numericamente superiores ao litoral sul, com diferenças significativas para os hidrocarbonetos não cancerígenos, naftaleno, antraceno e pireno e, os cancerígenos, benzo[e]pireno e benzo[a]pireno. Para a *C. rhizophorae*, os valores médios de ambas as localidades foram próximos, sem diferenças estatisticamente significativas (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração média e desvio padrão de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em espécimes de *A. brasiliiana* e *C. rhizophorae* coletadas na costa de Pernambuco, expressas em $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso úmido.

HPAs	<i>A. brasiliiana</i>		<i>C. rhizophorae</i>	
	Litoral Norte ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	Litoral Sul ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	Litoral Norte ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	Litoral Sul ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)
Não cancerígenos				
Naftaleno	$9,76 \pm 3,05^a$	$2,35 \pm 3,51^b$	$2,41 \pm 2,24^a$	$2,84 \pm 3,86^a$
Acenaftileno	0 ± 0^a	0 ± 0^a	0 ± 0^a	0 ± 0^a
Fluoreno	$0,10 \pm 0,22^a$	0 ± 0^a	0 ± 0^a	0 ± 0^a
Antraceno	$4,39 \pm 0,31^a$	$3,00 \pm 1,71^b$	$2,33 \pm 1,33^a$	$2,15 \pm 1,30^a$
Fenantreno	$0,54 \pm 0,50^a$	0 ± 0^a	$0,20 \pm 0,44^a$	0 ± 0^a
Fluoranteno	$0,74 \pm 0,57^a$	0 ± 0^b	$0,30 \pm 0,41^a$	$0,13 \pm 0,29^a$
Pireno	$0,93 \pm 0,89^a$	$0,08 \pm 0,17^b$	0 ± 0^a	0 ± 0^a
Cancerígenos				
Benzo[a]antraceno	$0,13 \pm 0,29^a$	0 ± 0^a	$0,85 \pm 0,78^a$	$1,11 \pm 0,33^a$
Criseno	$0,35 \pm 0,32^a$	0 ± 0^a	$1,91 \pm 0,67^a$	$2,22 \pm 0,45^a$

Benzo[b]fluoranteno	0,09±0,19 ^a	0±0 ^a	2,02 ± 0,38 ^a	2,14 ± 0,59 ^a
Benzo[e]pireno	3,08±0,31 ^a	1,02±1,41 ^b	1,07 ± 0,61 ^a	1,08 ± 0,32 ^a
Benzo[k]fluoranteno	0,82±1,84 ^a	0±0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
Benzo[a]pireno	4,54±0,37 ^a	1,53±2,11 ^b	0,71 ± 0,47 ^a	0,56 ± 0,51 ^a
Dibenzo[a,h]antraceno	0±0 ^a	0±0 ^a	0,23 ± 0,31 ^a	0,11 ± 0,26 ^a
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	1,21±1,66 ^a	0,52± 1,17 ^a	0,11 ± 0,25 ^a	0,38 ± 0,36 ^a
Benzo[g,h,i]perileno	1,73± 0,24 ^a	1,46± 0,22 ^a	0,69 ± 0,42 ^a	0,43 ± 0,40 ^a

¹Letras diferentes na mesma linha para a mesma espécie mostram diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Os compostos naftaleno e antraceno foram os principais contribuintes para a concentração total de 16 HPAs de ambas as espécies. Tais resultados, são similares com os achados de Soares et al. (2021), que relatou o naftaleno como o principal composto da $\Sigma 16$ HPA em bivalves coletados no estado de Sergipe, entre outubro de 2019 e janeiro de 2020. Mas diferem dos achados por Magalhães et al. (2022) na costa pernambucana, onde os compostos mais frequentes nas amostras foram fenantreno, fluoranteno e pireno.

De toda forma, os resultados do presente estudo, assim como os citados, confirmam que existe uma maior prevalência de HPAs de baixo peso molecular em animais expostos a derramamento de óleo, devido a menor eficácia de metabolização, quando comparados como os HPAs de maior peso molecular (ROMERO *et al.*, 2018).

Devido a capacidade de bioacumulação dos moluscos, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos que interagem com os tecidos dos animais produzem uma variedade de lesões, com a capacidade de ligar-se à superfície celular e interferir com os processos biológicos mediados pela membrana celular, sendo, portanto, compostos irritantes e causam respostas inflamatórias localizadas (NEFF *et al.*, 1987).

Os bivalves, particularmente, têm uma atividade baixa ou indetectável de sistemas enzimáticos que metabolizam produtos químicos tóxicos, como os HPAs (LIONETTO *et al.*, 2001). As brânquias possuem suas estruturas de filamentos e lamelas que proporciona uma área de superfície muito grande para contato direto e contínuo com contaminantes na água. Os efeitos desta interação podem ser compreendidos e identificados por meio da histopatologia,

que fornece informações sobre a saúde geral dos animais e as mudanças específicas causadas pela presença de contaminantes nos tecidos.

Al-Hashem (2017), no seu estudo com a ostra *Pinctada radiata* descreve brânquias normais como possuidoras de duas longas “lâminas” ramificadas, que são individualmente dobradas para criar uma lamela descendente e ascendente formando quatro dobras. Ao longo de todo o comprimento, a brânquia percorre o espaço interlamelar, que em locais é dividido pelas divisórias ou septos interlamelares em uma série de compartimentos verticais chamados de tubos de água.

Macroscopicamente, os animais analisados não apresentaram alterações, entretanto, em ambas as espécies foram identificados danos nas estruturas branquiais. Foi quantificado o percentual de amostras que possuíam a estrutura totalmente comprometida, e foi encontrado um maior percentual no litoral norte para ambas as espécies, onde mais de 70% dos animais analisados não possuíam as estruturas branquiais íntegras. Os espécimes amostrados no litoral sul, apresentaram menos severidade nas lesões e menor percentual de indivíduos com as estruturas degeneradas (Tabela 2).

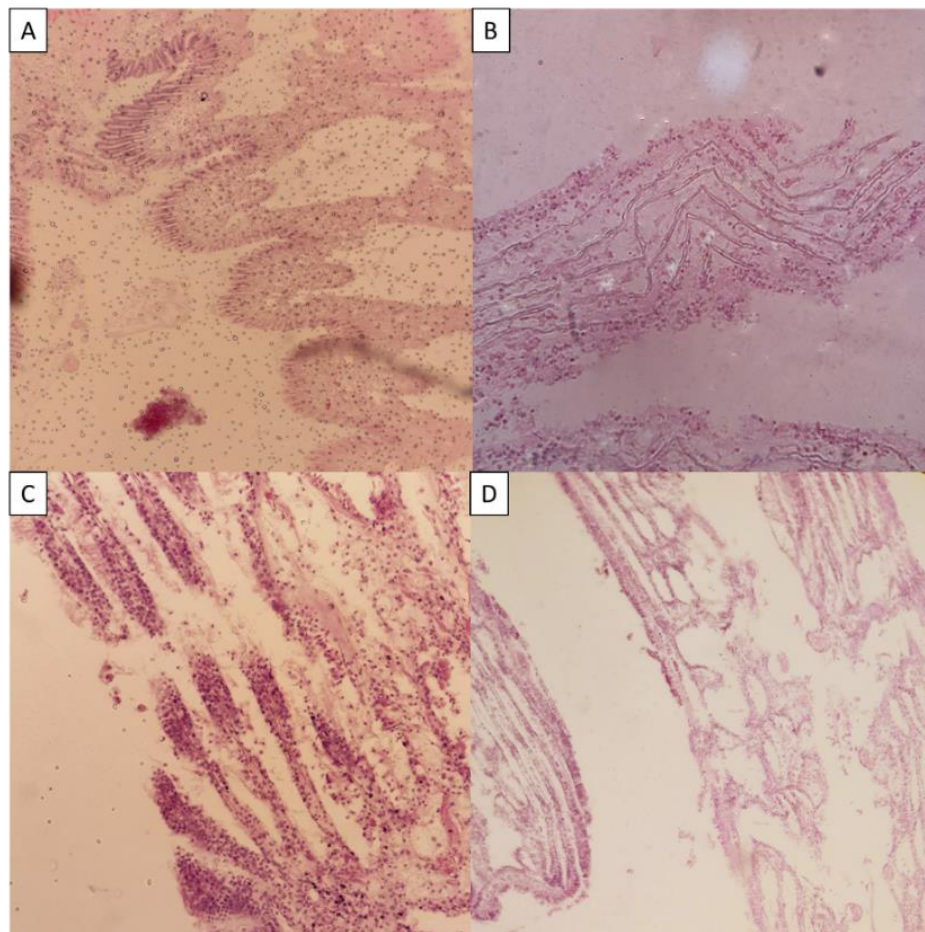
Tabela 2. Percentual de estruturas branquiais não íntegras de *A. brasiliiana* e *C. rhizophorae* coletadas no litoral pernambucano.

Local	Litoral Norte	Litoral Sul
<i>A. brasiliiana</i>	77 ^a	10 ^b
<i>C. rhizophorae</i>	73,33 ^a	42,86 ^b

¹Letras diferentes na mesma linha mostram diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Para as amostras coletadas no litoral norte, foi possível observar a degeneração completa dos filamentos das brânquias (Figura 3B e 3D), com perda das junções interlamelares. O mesmo pôde ser observado de forma mais branda para as amostras coletadas no litoral sul, onde foi possível identificar as estruturas lamelares (Figura 3A e 3C).

Figura 3. Estruturas das lamelas branquiais de ostras e mariscos coletados no litoral pernambucano (A) Lamelas de *A. brasiliiana* coletadas no litoral sul, (B) Lamelas de *A. brasiliiana* coletadas no litoral norte, (C) Lamelas de *C. rhizophorae* coletadas no litoral sul, (D) Lamelas de *C. rhizophorae* coletadas no litoral norte.



Os resultados são similares aos relatados em estudos sobre a influência da exposição a HPAs nas brânquias dos bivalves (AL-HASHEM, 2017; AL-HASHEM; BEHBEHANI, 2016). Além disso, os sinais histopatológicos descritos tendem a influenciar grandemente a saúde animal por perturbar a homeostase e o funcionamento adequado de processos biológicos vitais, como desintoxicação, respiração e osmoregulação (AU, 2004) .

Em suma, mesmo após três anos do derramamento do óleo na costa pernambucana, os dados apresentados demonstram a permanência dos resíduos do óleo, evidenciada principalmente pela presença dos HPAs de baixo peso molecular naftaleno e antraceno, porém em menor concentração, quando comparada a estudos anteriores. Como consequência, é possível observar através das mudanças histológicas observadas nas brânquias das espécies estudadas a contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos está afetando a saúde dos bivalves, principalmente no litoral norte do estado.

Referências

AL-HASHEM, M. A. Gill Histopathological Effects of PAHs on Adult Pearl Oyster, *Pinctada radiata* at Al-Khiran Coast in Kuwait. **Journal of Environmental Protection**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 109–119, 2017. Disponível em: <http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=74062>. Acesso at: 14 Aug. 2022.

AL-HASHEM, M.; BEHBEHANI. Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with the massive mortalities of pearl oyster *Pinctada radiata* at Al-Khiran coast in Kuwait during November 2013. *In: [S. l.: s. n.]*, 2016. p. 91–107.

AU, D. W. T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. **Marine pollution bulletin**, [s. l.], v. 48, n. 9–10, p. 817–834, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15111029/>. Acesso at: 14 Aug. 2022.

BELL A., Thomas; LIGHTNER, V., A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. Arizona, USA: World Aquaculture Society, 1988. ISBN 0-935868-37-2.

BOEHS, G., VILLALBA, A., CEUTA, L. O., & LUZ, J. R., Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira river (Ilhéus, Bahia, Brazil). **Journal of Invertebrate Pathology**, 103(1), 43–47, 2010.

CANESI, L. *et al.* Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. **Marine Environmental Research**, [s. l.], v. 76, p. 16–21, 2012. Disponível em: Acesso at: 9 Jul. 2022.

EPA, Method 3545A - pressurized fluid extraction (PFE), revision 1, of the test methods for evaluation solid wastes, physical/chemical methods, **EPA publication SW-846**, 16p, 2007. Available at. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/3545a.pdf>. accessed on 30-Aug-2021

GALLEGO BLANCO, S. **Biodegradation of PAHs: analysis and stimulation of degrading bacterial populations**. 2012. 1–182 f. - Universitat de Barcelona, Barcelona, 2012. Disponível em: <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/42415>. Acesso at: 2 Sep. 2022.

JOSHY, A. *et al.* Histopathological evaluation of bivalves from the southwest coast of India as an indicator of environmental quality. **Aquatic Toxicology**, [s. l.], v. 243, p. 106076, 2022.

KADRI, T. *et al.* Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review. **Journal of Environmental Sciences**, [s. l.], v. 51, p. 52–74, 2017.

KÄSTNER, M. Degradation of Aromatic and Polyaromatic Compounds. *In*: BIOTECHNOLOGY. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008. p. 211–239.

LIONETTO, M. G. *et al.* Biomonitoring of heavy metal contamination along the Salento coast (Italy) by metallothionein evaluation in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus*. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 305–310, 2001. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/aqc.458>. Acesso at: 14 Aug. 2022.

MAGALHÃES, K. M. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fishery resources affected by the 2019 oil spill in Brazil: Short-term environmental health and seafood safety. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 175, p. 113334, 2022.

MARTINS, M. *et al.* Comparative DNA damage and oxidative effects of carcinogenic and non-carcinogenic sediment-bound PAHs in the gills of a bivalve. **Aquatic Toxicology**, [s. l.], v. 142–143, p. 85–95, 2013.

MÜLLER, M. N. *et al.* Cellular accumulation of crude oil compounds reduces the competitive fitness of the coral symbiont *Symbiodinium glynnii*. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 289, p. 117938, 2021.

NEFF, J. M. *et al.* Histopathologic and Biochemical Responses in Arctic Marine Bivalve Molluscs Exposed to Experimentally Spilled Oil. **ARCTIC**, [s. l.], v. 40, n. 5, 1987.

NOAA-FDA. **Protocol for Interpretation and Use of Sensory Testing and Analytical Chemistry Results for Re-Opening Oil-Impacted Areas Closed to Seafood Harvesting Due to The Deepwater Horizon Oil Spill | FDA**. [S. l.], 2010. Disponível em:

<https://www.fda.gov/food/food-safety-during-emergencies/protocol-interpretation-and-use-sensory-testing-and-analytical-chemistry-results-re-opening-oil#top>. Acesso at: 12 Aug. 2022.

OROS, D. R.; ROSS, J. R. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves from the San Francisco estuary: Spatial distributions, temporal trends, and sources (1993–2001). **Marine Environmental Research**, [s. l.], v. 60, n. 4, p. 466–488, 2005.

PINTO, Stefane de Lyra. Os moluscos *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) e *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786) como bioindicadores de poluição orgânica no estuário da baía do Pina, Recife-PE, Brasil. 2012

ROMERO, I. C. *et al.* Decadal Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mesopelagic Fishes from the Gulf of Mexico Reveals Exposure to Oil-Derived Sources. **Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 52, n. 19, p. 10985–10996, 2018. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.8b02243>. Acesso at: 12 Aug. 2022.

SOARES, E. C. *et al.* Oil impact on the environment and aquatic organisms on the coasts of the states of Alagoas and Sergipe, Brazil - A preliminary evaluation. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 171, p. 112723, 2021.

STREHSE, J. S.; MASER, E. Marine bivalves as bioindicators for environmental pollutants with focus on dumped munitions in the sea: A review. **Marine Environmental Research**, [s. l.], v. 158, p. 105006, 2020.

THOMPSON, K.-L.; PICARD, C. R.; CHAN, H. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in traditionally harvested bivalves in northern British Columbia, Canada. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 121, n. 1–2, p. 390–399, 2017.

UFRPE - Relatório Final De 2019 (6º Relatório) Da Ação Emergencial Pós Derramamento De Óleo Para Segurança Alimentar Do Pescado Em Pernambuco, 2020. Disponível em: https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/prop_mostrarintegra;jsessionid=node02esw42a0snpa1xnjnz8y71ocx4356219.node0?codteor=1950884&filename=DOCCPI+180/2020+CPIOL EO. Acesso at: 08 set. 2022.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 5th. ed. [S. l.]: Pearson Education Limited, 2013.

ZEIDAN, G. C., LUZ, M. dos S. A., & BOEHS, G., Parasites of economically important bivalves from the southern coast of Bahia State, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21(4), 391–398, 2012.

ZHANG, P.; SONG, J.; YUAN, H. Persistent organic pollutant residues in the sediments and mollusks from the Bohai Sea coastal areas, North China: An overview. **Environment International**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 632–646, 2009.

2.2 Artigo 2 - Avaliação e caracterização das populações bacterianas de *Anomalocardia brasiliana* e *Crassostrea rhizophorae* em estuários de Pernambuco após derramamento de óleo.

Artigo científico a ser encaminhado a Revista – Journal of Food Safety. Todas as normas de redação e citação, deste capítulo, atendem as estabelecidas pela referida revista (<https://onlinelibrary.wiley.com/journal/17454565>)

Avaliação e caracterização das populações bacterianas de *Anomalocardia brasiliiana* e *Crassostrea rhizophorae* em estuários de Pernambuco após derramamento de óleo.”

Resumo

Os bivalves *Anomalocardia brasiliiana* e *Crassostrea rhizophorae* estão presentes em abundância na costa pernambucana. Após o derramamento de óleo ocorrido em 2019, estas espécies tornaram-se relevante para estudos que monitorem os níveis de contaminação nos recursos pesqueiros locais. Tendo isso, o presente estudo objetivou a avaliar a presença e caracterizar as populações bacterianas potencialmente patogênicas de ambas as espécies nos estuários do Estado de Pernambuco após o derramamento de óleo. Para isso, foram amostradas 5 dúzias de ostras (*C. rhizophorae*) e mariscos (*A. brasiliiana*), em pontos do litoral norte e sul do estado de Pernambuco. Foram quantificados as contagens total de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas, *Staphylococcus* coagulase positiva e determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes, seguindo as orientações analíticas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Além disso, foram caracterizadas por sequenciamento (usando primers universais de regiões codificadoras do gene 16S rRNA) isolados bacterianos obtidos nos diferentes pontos visando a identificação das espécies de bactérias presentes no ambiente. Foram observadas diferenças entre as contagens das bactérias mesófilas e psicotróficas de ambas as espécies em relação aos pontos de coleta, embora estas estivessem abaixo do limiar adotado para segurança alimentar. Para o gênero *Staphylococcus*, os resultados obtidos estão de acordo com a legislação Brasileira vigente, não sendo encontrados *Staphylococcus* coagulase-positiva. Para as contagens de coliformes totais e termotolerantes, a maior média foi observada entre os mariscos e as ostras do litoral norte, não sendo identificados nas amostras coliformes termotolerantes. Para o sequenciamento, o gênero *Bacillus* foi o mais abundante para ambas as espécies. Com base nos resultados, é possível afirmar que mediante a legislação brasileira as amostras observadas estão aptas microbiologicamente para consumo humano.

Palavras-chave: Segurança alimentar, Qualidade microbiológica, Molusco, Pernambuco.

Introdução

A contaminação dos recursos marinhos é uma ameaça à saúde pública, particularmente quando relacionada a organismos filtradores, como os moluscos bivalves (DORÉ *et al.*, 2010), por terem a capacidade de acumular diferentes microrganismos, tornando-os importantes transmissores de patógenos (CAMPOS *et al.*, 2017; PARK *et al.*, 2018).

A qualidade microbiológica dos bivalves está diretamente relacionada com a qualidade sanitária das condições ambientais onde estão inseridos. Fontes de contaminação nestes locais, geralmente resultam de alterações no ambiente. Na costa brasileira, as principais causas de mudanças ambientais, são a ocupação desordenada de encostas costeiras, especulação imobiliária, exploração de recursos energéticos e atividades relacionadas, que resultam na descarga de produtos domésticos e efluentes industriais (GIANGASPERO *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2012)

Em todo o mundo, surtos de doenças de origem alimentar associadas ao consumo de moluscos foram relatadas, com a maioria dos casos estando atrelados ao consumo de ostras, mariscos e mexilhões (ALFANO-SOBSEY *et al.*, 2012; BELLOU; KOKKINOS; VANTARAKIS, 2013; WALL *et al.*, 2011), havendo uma intensificação dos casos de intoxicação alimentar decorrentes do consumo de moluscos crus ou parcialmente cozidos (MMA 2018; MACEDO *et al.*, 2016).

Para um controle sanitário eficiente, visando o consumo de moluscos bivalves, o monitoramento microbiológico rotineiro das populações se faz necessário, sendo essencial a detecção dos microrganismos em concentrações baixas, a fim de evitar riscos para a higiene e a saúde pública (KACAR, 2011).

As espécies de mariscos *Anomalocardia brasiliana* e a ostra *Crassostrea rhizophorae* são consideradas as espécies marinhas mais exploradas comercialmente e consumidas na costa brasileira (BOEHS *et al.*, 2010; ZEIDAN; LUZ; BOEHS, 2012) constituindo-se como espécies candidatas ao monitoramento da microbiota.

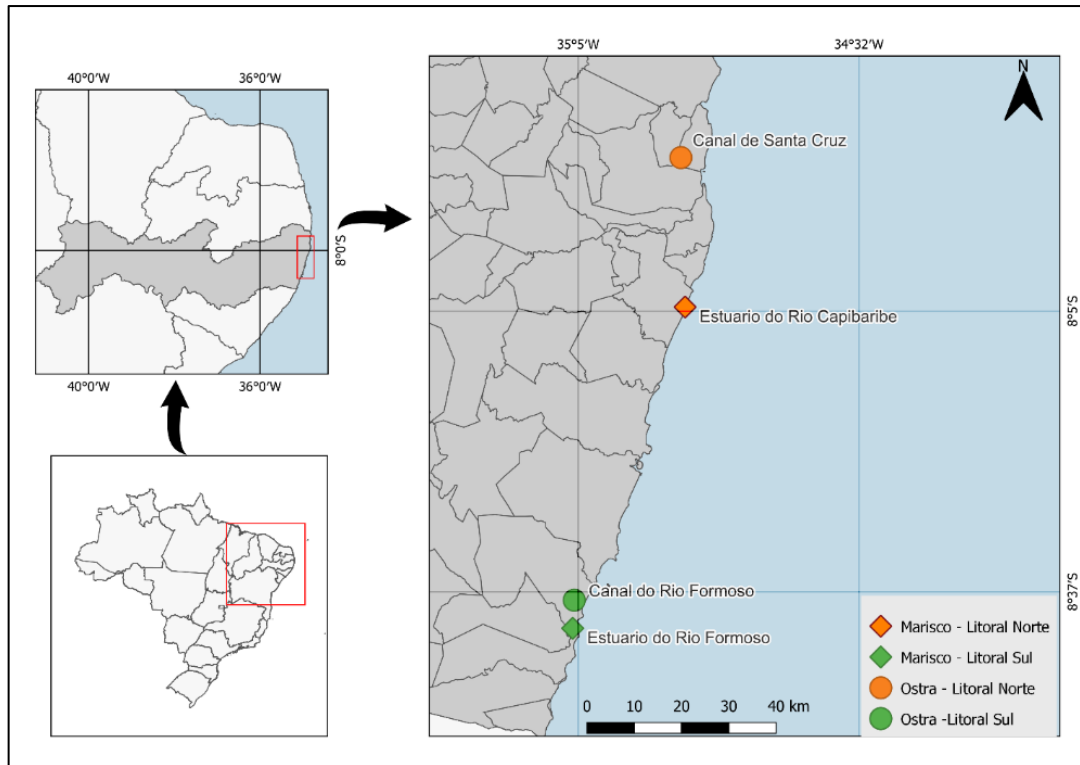
Material e métodos

Coleta e acondicionamento das amostras

Foram coletadas amostras de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) e mariscos (*Anomalocardia brasiliana*), com comprimento médio de $5,52 \pm 0,67$ mm e $2,70 \pm 0,20$ mm respectivamente, em pontos dos Litorais Norte (LN) e Sul (LS) de Pernambuco, entre os meses de março e junho de 2022. As coletas dos mariscos foram realizadas no estuário do rio

Capibaribe (Recife – PE, Litoral Norte) e do Rio Formoso (Rio Formoso – PE, Litoral Sul), e das ostras, nos estuários do Canal de Santa Cruz (Itapissuma- PE, Litoral Norte) e do Rio Formoso ((Rio Formoso – PE, Litoral Sul) (Figura 4).

Figura 4. Pontos de coleta nos Litorais Norte e Sul de Pernambuco (Brasil)



Imediatamente após a retirada do ambiente, os animais foram acondicionados em caixas isotérmicas, à temperatura entre 4 e 10 °C até o processamento, que ocorreu dentro do limite de 24 horas para que fosse mantida a integridade das mesmas.

Análise microbiológica e molecular

Para avaliação microbiológica, foram determinadas a contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas, a contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase positivo e o Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes, seguindo as orientações analíticas da Instrução Normativa nº62/2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2003). A determinação de contagem de bactérias psicotróficas foi feita de acordo com (DA SILVA *et al.*, 2018).

Igualmente estas mesmas amostras foram semeadas em ágar tripton de soja (TSA) com posterior incubação a 30°C por 48 horas, visando a seleção de isolados. Para tal, cada placa teve 3 colônias com morfologias distintas selecionada aleatoriamente. O DNA genômico foi então extraído usando o Kit Wizard® genomic DNA purification (Promega™ Corporation,

EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. A quantificação do DNA extraído foi feita através de espectrofotômetro (Nanovue Plus™, Biochrom, EUA) utilizando uma absorbância de 260 nm e a pureza segundo a razão A260/A280 nm (DHALIWAL, 2013). A qualidade do DNA foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), na qual foi confirmada a integridade do DNA.

Posteriormente foi efetuada à amplificação dos amplicons, usando primers universais de regiões codificadoras do gene 16S rRNA (Tabela 3), e em seguida, o produto foi purificado utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega™ Corporation, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. Os amplicons purificados foram submetidos a uma nova amplificação utilizando o primer forward ou reverse. As amostras foram sequenciadas pelo sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA). A identificação das bactérias foi realizada através da comparação das sequências obtidas, utilizando a ferramenta BLAST, com base nos dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), seguindo a metodologia descrita por Roselet (2008).

Tabela 3. Sequências de dos primers das regiões codificadoras do gene 16S.

Primer	Sequência do Primer (5' - 3')	Referência
16S-27f	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	(LANE, 1991)
16S-907r	CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT	(LANE, 1991)

Análise estatística

Os dados amostrados foram previamente analisados quanto à homogeneidade e normalidade pelos testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Para a análise estatística, visando a comparação entre os pontos de coleta foi utilizada o teste U de Mann-Whitney (ZAR, 2013). Todos os dados foram analisados com o auxílio do software IBM SPSS Statistics versão 25.0.0.0.

Resultados e discussão

A contagem de bactérias mesófilas, e o subgrupo das bactérias psicotróficas (bactérias que crescem em alimentos sob refrigeração de 0°C a 7°C) não diferencia os tipos bacterianos, sendo utilizado para a obtenção de informações gerais sobre a qualidade sanitária dos produtos, pois relaciona a presença de elevadas populações de bactérias como indicativo de deficiências

sanitárias (DA SILVA *et al.*, 2018). No presente estudo, houve diferença estatisticamente significativa entre as contagens das bactérias mesófilas e psicotróficas de ambas as espécies em relação aos pontos de coleta ($P > 0,05$). A espécie *A. brasiliiana*, obteve as maiores médias de UFC/g para as bactérias mesófilas nos dois os pontos estudados, com $11,69 \times 10^5$ e $1,29 \times 10^5$ para os litorais norte e sul, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Contagem bacteriana das mesófilas, psicotrófica e do gênero *Staphylococcus* nos diferentes pontos de coleta.

Local	Mesófilas	Psicotróficas	<i>Staphylococcus</i>
<i>A. brasiliiana</i>			
Litoral Norte ($\times 10^5$ UFC/g)	$11,69 \pm 10,05^a$	0 ± 0^a	$3,24 \pm 2,13^a$
Litoral Sul ($\times 10^5$ UFC/g)	$1,29 \pm 0,78^b$	$1,23 \pm 0,90^b$	$2,14 \pm 0,99^a$
<i>C. rhizophorae</i>			
Litoral Norte ($\times 10^5$ UFC/g)	$0,19 \pm 0,09^a$	$0,21 \pm 0,11^a$	$4,64 \pm 3,85^a$
Litoral Sul ($\times 10^5$ UFC/g)	$0,90 \pm 0,59^b$	$0,39 \pm 0,27^b$	$0,60 \pm 0,37^b$

*Letras diferentes na mesma linha mostram diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Em uma análise sobre a qualidade microbiológica de ostras *Crassostrea brasiliiana* e sururu *Mytella falcati* da Baía de Sepetiba no Rio de Janeiro, Nascimento *et al.* (2011), constataram contagens de bactérias mesófilas e psicotróficas na ordem de 10^6 UFC/g. Em um outro estudo, com o mexilhão *Perna perna* também capturado no Rio de Janeiro, Andrade *et al.* (2022), observou contagens para as bactérias mesófilas de 1.1×10^4 . Os bivalves, por serem filtradores, apresentam contagens bacterianas que refletem o estado microbiológico do ambiente, sendo então, diferente em cada localidade.

No Brasil, a contagem de bactérias mesófilas não é adotada como parâmetro sanitário nos alimentos, mas para a Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF), as contagens não devem ultrapassar o valor máximo de 10^7 CFU/g, determinando que, acima deste valor, o consumo do molusco torna-se inviável (ICMSF, 2018). As contagens observadas no presente estudo, foram abaixo do limiar adotado pela ICMSF.

Para o gênero *Staphylococcus*, as ostras apresentaram diferença significativa entre os pontos de coleta. O litoral norte obteve o maior valor médio, $4,64 \times 10^5$ UFC/g, em contraste com a contagem observada no litoral sul, $0,60 \times 10^5 \pm 0,37$ UFC/g. Para os mariscos, não houve

diferença estatística, com os valores médios das contagens sendo $3,24 \pm 2,13$ e $2,14 \pm 0,99$ para o litoral norte e sul, respectivamente (Tabela 4Tabela 4Tabela 4).

Todos os isolados testados foram classificados como pertencentes ao grupo coagulase-negativo, que sugere a ausência de *Staphylococcus aureus*, estando de acordo com a legislação Brasileira vigente que delimita a margem de tolerância para *Staphylococcus* coagulase-positiva como 10^3 UFC/g (BRASIL, 2014).

Os resultados encontrados diferem dos achados por Andrade et al. (2022), onde as contagens de *Staphylococcus* coagulase-positiva variaram de $1,7 \times 10^2$ CFU/g a $3,4 \times 10^5$ CFU/g, e, por Silva et al. (2021), em um estudo com mexilhões *Perna perna* no estado do Espírito Santo, que reportou uma densidade de *S. aureus* variando de $1,28 \times 10^2$ a $4,35 \times 10^3$ UFC/g.

Para as contagens de coliformes totais, no presente estudo, as concentrações médias dos coliformes totais variaram entre os pontos, sendo a maior média entre os mariscos (*A. brasiliana*) e as ostras (*C. rhizophorae*) do litoral norte, provavelmente devido a maior proximidade de centros urbanos e seus efluentes (Tabela 5Tabela 5). Não foram identificados nas amostras coliformes termotolerantes.

Tabela 5. Contagem de coliformes totais nos diferentes pontos de coleta.

Local	Coliformes Totais (NMP/g)	Intervalo de confiança (95%)	
<i>A. brasiliana</i>			
Litoral Norte	>1100	420	.-
Litoral Sul	93	18	420
<i>C. rhizophorae</i>			
Litoral Norte	240	42	1000
Litoral Sul	<3,0	.-	9,5

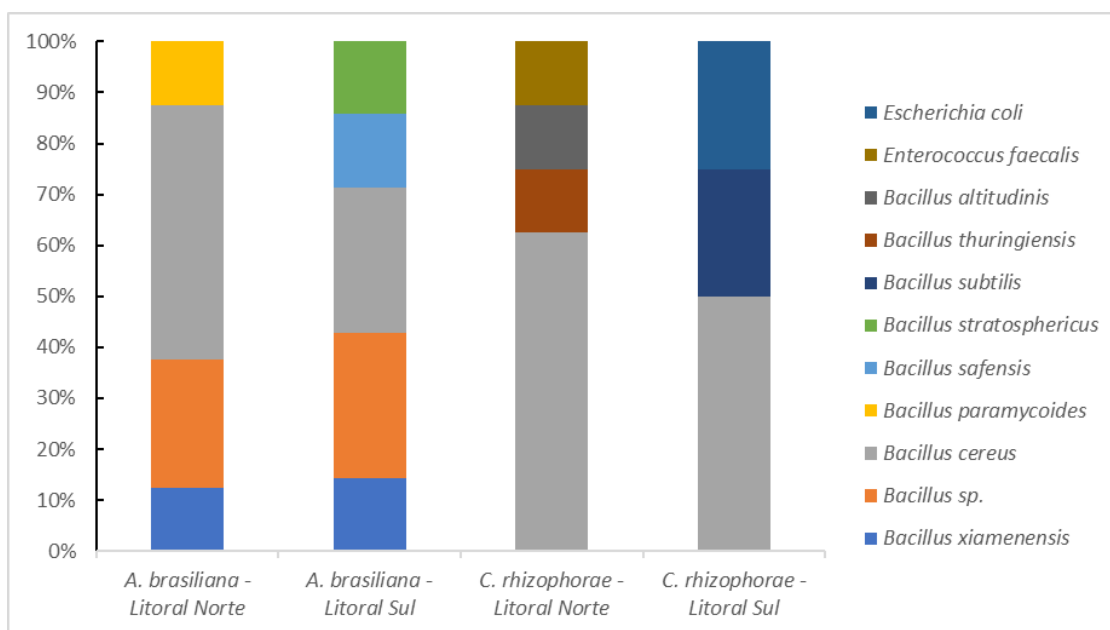
Inicialmente, as contagens de coliformes eram indicadores de contaminação por material fecal, e por consequência a possível presença de patógenos entéricos como a *Salmonella* (KORNACKI; GURTLER; STAWICK, 2015). Atualmente, a correlação direta entre altos números de *E. coli*, coliformes termotolerantes e coliformes totais em alimentos com contaminação fecal não é mais válida, em grande parte, por não serem habitantes obrigatórios do trato intestinal de animais de sangue quente, e pela presença natural em uma série de reservatórios ambientais diferentes (DA SILVA et al., 2018).

Outros estudos, como o de Andrade et al. (2022) e Silva et al. (2021), encontraram variações de 9×10 a $4,6 \times 10^4$ NMP/g e 28 a >1.600 NMP /g respectivamente, com a presença de coliformes termotolerantes, diferindo dos resultados encontrados no presente estudo.

De toda forma, a legislação brasileira permite, para moluscos bivalves, a presença de coliformes termotolerantes na concentração de 5×10 UFC/g, estando então as amostras de acordo com a legislação nacional (BRASIL, 2019).

O sequenciamento permite a diferenciação das espécies bacterianas a partir das diferenças na composição dos pares de base (ERCOLINI, 2004), e fornece uma visão da estrutura da população principalmente, a abundância relativa da principal comunidade bacteriana (LA VALLEY *et al.*, 2009). No presente estudo, dos 15 isolados de cada ponto de coleta, 11 espécies bacterianas foram identificadas, sendo o gênero *Bacillus* mais abundante em ambas as espécies, e para os mariscos, o único gênero identificado (Figura 5).

Figura 5. Abundância relativa da composição da comunidade bacteriana de *A. brasiliana* e *C. rhizophorae*.



No ambiente marinho, as bactérias são um componente importante do ciclo do carbono (AZAM; LONG, 2001; MOU *et al.*, 2008), dentre elas, muitas espécies, como as do gênero *Alcanivorax* são capazes de metabolizar hidrocarbonetos como uma fonte de energia (DE LORENZO, 2006; KIMES *et al.*, 2014). Assim, em cenários como o do derramamento de óleo a população das bactérias capazes de decompor o óleo apresenta um enorme crescimento (DE LORENZO, 2006).

As cepas de *Bacillus* caracterizam grupos bacterianos filogeneticamente e fenogeneticamente heterogêneos. Eles são ubíquos no ambiente marinho e podem tolerar condições adversas, tais como alta temperatura, pressão, salinidade, e pH (RAMPELOTTO, 2010), entretanto, as cepas de *Bacillus* precisam de abundante nutrição e espaço para ter um crescimento amplo, por esta razão competem com outros organismos, chegando a produzir compostos bioativos potentes para lutar contra seus concorrentes ou para fuga da micropredação (PAUL *et al.*, 2007; SAYEM *et al.*, 2011).

Dentro do cenário adverso que é um ambiente contaminado por Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), como ocorrido, na costa nordeste após o derramamento de óleo de 2019 (MAGALHÃES *et al.*, 2022; SOARES *et al.*, 2020), é provável que através da fuga da micro predação, as cepas do gênero *Bacillus* colonizaram os tecidos dos bivalves, tornando-os mais abundantes.

Para as ostras do litoral norte, além das espécies do gênero *Bacillus*, foi encontrado a presença de *Enterococcus faecalis* (identidade de 95,92%) e, para as ostras do litoral sul, além do gênero *Bacillus*, também foi identificada a presença de *Escherichia coli* (identidade de 99,2%) (Figura 5). Contudo, as porcentagens de identidade, não são suficientes para confirmar a presença desses microrganismos; mas podem ser usadas como indicadores, devido a capacidade filtradora dos bivalves que podem acumular esses microrganismos.

Tendo isso, é possível afirmar que para ambos os litorais avaliados, as espécies *Anomalocardia brasiliana* e *Crassostrea rhizophorae*, estão aptas para consumo humano perante a legislação brasileira.

Referências

ALFANO-SOBSEY, E. *et al.* Norovirus outbreak associated with undercooked oysters and secondary household transmission. **Epidemiology and Infection**, [s. l.], v. 140, n. 2, p. 276–282, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21524343/>. Acesso at: 26 Jul. 2022.

ANDRADE, N. M. de *et al.* Hygiene conditions of mussels *Perna perna* captured in Niterói, RJ, Brazil: thermal intervention and microbiological evaluation. **Food Science and Technology**, [s. l.], v. 42, 2022.

AZAM, F.; LONG, R. A. Sea snow microcosms. **Nature**, [s. l.], v. 414, n. 6863, p. 495–498, 2001.

BELLOU, M.; KOKKINOS, P.; VANTARAKIS, A. Shellfish-borne viral outbreaks: a systematic review. **Food and environmental virology**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 13–23, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23412719/>. Acesso at: 26 Jul. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 de agosto de 2003.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura., Manual do MPA para o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves - **PNCMB (2. ed.)**. Brasília: MPA, 2014.

CAMPOS, C. J. A. *et al.* Determining the zone of impact of norovirus contamination in shellfish production areas through microbiological monitoring and hydrographic analysis. **Water Research**, [s. l.], v. 124, p. 556–565, 2017.

DA SILVA, N. *et al.* Microbiological Examination Methods of Food and Water : A Laboratory Manual. **Microbiological Examination Methods of Food and Water**, [s. l.], 2018. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/9781315165011/microbiological-examination-methods-food-water-neusely-da-silva-marta-hiromi-taniwaki-val%C3%A9ria-christina-amstalden-junqueira-neliane-ferraz-de-arruda-silveira-margarete-midori-okazaki-renato-abeilar-romeiro-gomes>. Acesso at: 24 Jul. 2022.

DE LORENZO, V. Blueprint of an oil-eating bacterium. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 24, n. 8, p. 952–953, 2006.

DHALIWAL, A. Extração e purificação de DNA. **Materiais e Métodos** 2013;3:191, 16 p. 2013 Disponível em <http://www.labome.com.br/method/DNAExtractionandPurification.html>. Acesso em 27/07/2022.

DORÉ, B. *et al.* Management of health risks associated with oysters harvested from a norovirus contaminated area, Ireland, February-March 2010. **Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, [s. l.], v. 15, n. 19, p. pii/19567, 2010.

ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 297–314, 2004.

GIANGASPERO, A. *et al.* Cryptosporidium parvum genotype IIa and Giardia duodenalis assemblage A in Mytilus galloprovincialis on sale at local food markets. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 171, p. 62–67, 2014.

ICMSF. **Microorganisms in Foods 7**. Cham: Springer International Publishing, 2018.

KACAR, A. Some microbial characteristics of mussels (Mytilus galloprovincialis) in coastal city area. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 1384–1389, 2011.

KIMES, N. E. *et al.* Microbial transformation of the Deepwater Horizon oil spill—past, present, and future perspectives. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 5, 2014.

KORNACKI, J. L.; GURTLER, J. B.; STAWICK, B. A. 9. Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. *In*: COMPENDIUM OF METHODS FOR THE MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF FOODS. [S. l.]: American Public Health Association, 2015.

LA VALLEY, K. J. *et al.* Bacterial Community Profiling of the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*): Comparison of Culture-Dependent and Culture-Independent Outcomes. **Journal of Shellfish Research**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 827–835, 2009.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA Sequencing. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**, [s. l.], p. 115–175, 1991. Disponível em: https://books.google.com/books/about/Nucleic_Acid_Techniques_in_Bacterial_Sys.html?hl=pt-BR&id=89PwAAAAMAAJ. Acesso at: 26 Jul. 2022.

MACEDO, V. *et al.* Processamento artesanal de sururu (*Mytella guyanensis*) pelas marisqueiras da RESEX Baía do Iguape: avaliação da qualidade antes e após intervenção educativa. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 34–42, 2016. Disponível em: <https://visaemdebate.incqs.fiocruz.br/index.php/visaemdebate/article/view/825>. Acesso at: 26 Jul. 2022.

MAGALHÃES, K. M. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fishery resources affected by the 2019 oil spill in Brazil: Short-term environmental health and seafood safety. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 175, p. 113334, 2022.

MOU, X. *et al.* Bacterial carbon processing by generalist species in the coastal ocean. **Nature**, [s. l.], v. 451, n. 7179, p. 708–711, 2008.

NASCIMENTO, V. A. *et al.* **Qualidade Microbiológica de Moluscos Bivalves-Sururu e Ostras submetidos a tratamento térmico e estocagem congelada**. [S. l.: s. n.], 2011. Disponível em: www.scienciaplena.org.br.

PAUL, V. J. *et al.* Chemical Defenses: From Compounds to Communities. **The Biological Bulletin**, [s. l.], v. 213, n. 3, p. 226–251, 2007.

RAMPELOTTO, P. H. Resistance of Microorganisms to Extreme Environmental Conditions and Its Contribution to Astrobiology. **Sustainability**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. 1602–1623, 2010.

ROSELET, F. F. G.. Isolamento, cultivo e identificação de bactérias com potencial uso probiótico no cultivo de organismos aquáticos: Estudo de caso com bactérias do trato gastrointestinal do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). **Dissertação (Mestrado)**. 61 f. Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, RS, 2008.

SAYEM, S. A. *et al.* Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 74, 2011.

SILVA, B. R. da *et al.* Qualidade microbiológica da água e dos mexilhões Perna perna (Linnaeus, 1758) cultivados em Piúma, Espírito Santo, Brasil. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 89–95, 2021.

SOARES, A. M. *et al.* Avaliação Bacteriológica da Água Associada ao Cultivo de Mexilhões Perna Perna da Praia Rasa, Armação dos Búzios (RJ). **Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 45–58, 2015.

SOARES, M. de O. *et al.* Oil spill in South Atlantic (Brazil): Environmental and governmental disaster. **Marine Policy**, [s. l.], v. 115, p. 103879, 2020.

SOUZA, D. S. M. *et al.* Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 76, p. 153–161, 2012.

WALL, R. *et al.* Two New Zealand outbreaks of norovirus gastroenteritis linked to commercially farmed oysters. **The New Zealand medical journal**, [s. l.], v. 124, n. 1347, p. 63–71, 2011.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 5th. ed. [S. l.]: Pearson Education Limited, 2013.

3 Considerações finais

- Houve uma diminuição das concentrações dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos após três anos do derramamento do óleo na costa pernambucana;
- Perdura a permanência dos HPAs de baixo peso molecular naftaleno e antraceno;
- É possível observar mudanças histológicas nas brânquias dos bivalves estudados, sendo mais severo no litoral norte pernambucano;
- As contagens das bactérias mesófilas e psicotróficas observadas foram abaixo do limiar adotado internacionalmente para a segurança alimentar;
- A ausência de *Staphylococcus* coagulase-positiva e coliformes termotolerantes, está de acordo com a legislação Brasileira vigente;
- Os moluscos, de ambos os litorais avaliados, perante a legislação brasileira, estão aptos para consumo humano.

4 Referências

ALLAN, S. E.; SMITH, B. W.; ANDERSON, K. A. Impact of the Deepwater Horizon Oil Spill on Bioavailable Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Gulf of Mexico Coastal Waters. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 2033–2039, 2012.

ANVISA - Resolução-RDC N° 12, de 02 de Janeiro de 2001-
http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b

ARAÚJO, K. C. *et al.* Oil spill in northeastern Brazil: Application of fluorescence spectroscopy and PARAFAC in the analysis of oil-related compounds. **Chemosphere**, [s. l.], v. 267, p. 129154, 2021.

BAUMARD, P. *et al.* Origin and Bioavailability of PAHs in the Mediterranean Sea from Mussel and Sediment Records. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 77–90, 1998.

CAMPOS, C. J. A. *et al.* Determining the zone of impact of norovirus contamination in shellfish production areas through microbiological monitoring and hydrographic analysis. **Water Research**, [s. l.], v. 124, p. 556–565, 2017.

CANESI, L. *et al.* Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. **Marine Environmental Research**, [s. l.], v. 76, p. 16–21, 2012. Disponível em: Acesso at: 9 Jul. 2022.

FERREIRA, M. S. N.; DUARTE, M. R.; SILVA, E. P. da. Recursos Pesqueiros de Mariscagem: uma Revisão da Literatura Sobre Iphigenia brasiliensis. **Ensaio e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 24, 2019.

GARCIA, L. P. *et al.* Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em alimentos: uma revisão. **Pubvet**, [s. l.], v. 8, n. 19, 2014.

GOVERNO DO BRASIL, Mancha no litoral do Brasil, 2019, Disponível em: <<https://www.brasil.gov.br/manchanolitoral/o-oleo/>> , Acessado em: 13/02/2022.

IBAMA, Manchas de óleo litoral brasileiro, 2019, Disponível em: https://www.ibama.gov.br/phocadownload/emergenciasambientais/2020/manchasdeoleo/ibama-manchasdeoleodesmobilizacao-cartilha_v2.pdf, Acessado em: 13/02/2022.

GRAHAM, W. M. *et al.* Oil carbon entered the coastal planktonic food web during the Deepwater Horizon oil spill. **Environmental Research Letters**, [s. l.], v. 5, n. 4, 2010. Acessado em: 26/07/2022.

GYAWALI, P.; HEWITT, J. Faecal contamination in bivalve molluscan shellfish: Can the application of the microbial source tracking method minimise public health risks?. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, [s. l.], v. 16, p. 14–21, 2020. Disponível em: Acesso at: 9 Jul. 2022.

HELMHOLZ, H. *et al.* Seasonal and annual variations in physiological and biochemical responses from transplanted marine bioindicator species *Mytilus* spp. during a long term field exposure experiment. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 565, p. 626–636, 2016. Disponível em: Acesso at: 9 Jul. 2022.

HONDA, M.; SUZUKI, N. Toxicities of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons for Aquatic Animals. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 1363, 2020.

HOOD, M. A.; NESS, G. E.; BLAKE, N. J. Relationship among fecal coliforms, *Escherichia coli*, and *Salmonella* spp. in shellfish. **Applied and environmental microbiology**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 122–126, 1983.

JEONG, W.-G.; CHO, S. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure on the fertilization and larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Journal of Shellfish Research**, [s. l.], v. 24, p. 209–213, 2005.

JOSHY, A. *et al.* Histopathological evaluation of bivalves from the southwest coast of India as an indicator of environmental quality. **Aquatic Toxicology**, [s. l.], v. 243, p. 106076, 2022.

KUJAWINSKI, E. B. *et al.* Fate of Dispersants Associated with the Deepwater Horizon Oil Spill. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 1298–1306, 2011.

LESSA, G. C. *et al.* The 2019 Brazilian oil spill: Insights on the physics behind the drift. **Journal of Marine Systems**, [s. l.], v. 222, p. 103586, 2021.

LOURENÇO, R. A. *et al.* Mysterious oil spill along Brazil's northeast and southeast seaboard (2019–2020): Trying to find answers and filling data gaps. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 156, p. 111219, 2020.

MAGALHÃES, K. M. *et al.* Oil spill + COVID-19: A disastrous year for Brazilian seagrass conservation. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 764, p. 142872, 2021.

MAGALHÃES, K. M. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fishery resources affected by the 2019 oil spill in Brazil: Short-term environmental health and seafood safety. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 175, p. 113334, 2022.

MALLAH, Manthar Ali *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbon and its effects on human health: An overview. **Chemosphere**, [s. l.], v. 296, p. 133948, 2022.

MARINHA DO BRASIL, Combate ao óleo., 2019, Disponível em: <https://www.marinha.mil.br/combate-aooleo>, Acessado em: 13/07/2022.

MÜLLER, M. N. *et al.* Cellular accumulation of crude oil compounds reduces the competitive fitness of the coral symbiont *Symbiodinium glynnii*. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 289, p. 117938, 2021.

OLIVEIRA, J. *et al.* Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives – A mini-review. **Food Control**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 805–816, 2011.

OROS, D. R.; ROSS, J. R. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves from the San Francisco estuary: Spatial distributions, temporal trends, and sources (1993–2001). **Marine Environmental Research**, [s. l.], v. 60, n. 4, p. 466–488, 2005.

PARK, K. *et al.* Occurrence and virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seawater and bivalve shellfish of the Gyeongnam coast, Korea, in 2004–2016. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 137, p. 382–387, 2018. Disponível em: Acesso at: 9 Jul. 2022.

PENA, P. G. L. *et al.* Derramamento de óleo bruto na costa brasileira em 2019: emergência em saúde pública em questão. **Cadernos de Saúde Pública**, [s. l.], v. 36, n. 2, 2020.

PINTO, Stefane de Lyra. Os moluscos *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) e *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786) como bioindicadores de poluição orgânica no estuário da baía do Pina, Recife-PE, Brasil. 2012

PITTURA, L. *et al.* Microplastics as Vehicles of Environmental PAHs to Marine Organisms: Combined Chemical and Physical Hazards to the Mediterranean Mussels, *Mytilus galloprovincialis*. **Frontiers in Marine Science**, [s. l.], v. 5, 2018.

POTASMAN, I.; PAZ, A.; ODEH, M. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: A worldwide perspective. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 35, n. 8, p. 921–928, 2002. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/35/8/921/329887>. Acesso at: 9 Jul. 2022.

REDDY, C. M. *et al.* Composition and fate of gas and oil released to the water column during the Deepwater Horizon oil spill. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 109, n. 50, p. 20229–20234, 2012.

SARKER, S. *et al.* DNA damage in marine rock oyster (*Saccostrea Cucullata*) exposed to environmentally available PAHs and heavy metals along the Arabian Sea coast. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 151, p. 132–143, 2018. Disponível em: Acesso at: 9 Jul. 2022.

SOARES, E. C. *et al.* Oil impact on the environment and aquatic organisms on the coasts of the states of Alagoas and Sergipe, Brazil - A preliminary evaluation. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 171, p. 112723, 2021.

SOARES, M. de O. *et al.* Oil spill in South Atlantic (Brazil): Environmental and governmental disaster. **Marine Policy**, [s. l.], v. 115, p. 103879, 2020.

STREHSE, J. S.; MASER, E. Marine bivalves as bioindicators for environmental pollutants with focus on dumped munitions in the sea: A review. **Marine Environmental Research**, [s. l.], v. 158, p. 105006, 2020.

SUZUKI, N. *et al.* Toxicities of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fish and Marine Invertebrates. *In: POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS*. Singapore: Springer Singapore, 2018. p. 245–259.

VAN DOLAH, R. F. *et al.* Estuarine habitat quality reflects urbanization at large spatial scales in South Carolina's coastal zone. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 390, n. 1, p. 142–154, 2008. Disponível em: Acesso at: 9 Jul. 2022.

WANG, X. *et al.* Characterizing the parent and oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments of Hong Kong. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 98, n. 1–2, p. 335–340, 2015.

WHO. Environmental health criteria 202: Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. **International Programme on Chemical Safety**. World Health Organisation, Geneva, 1998.

YAZDANI, M. Comparative toxicity of selected PAHs in rainbow trout hepatocytes: genotoxicity, oxidative stress and cytotoxicity. **Drug and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 71–78, 2020.