



Programa de Pós-Graduação
Ecologia Aquática
e Pesca



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA

IRINA SOFIA CARDOSO DE CARVALHO

**INFLUÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS SOBRE RESPOSTAS
BIOQUÍMICAS E ELETROFISIOLÓGICAS DA OSTRADO-MANGUE
Crassostrea gasar (BIVALVIA, OSTREIDAE)
DE DUAS RESEX AMAZÔNICAS**

Belém – PA

2021

IRINA SOFIA CARDOSO DE CARVALHO

**INFLUÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS SOBRE RESPOSTAS
BIOQUÍMICAS E ELETROFISIOLÓGICAS DA OSTRADO-MANGUE
Crassostrea gasar (BIVALVIA, OSTREIDAE)
DE DUAS RESEX AMAZÔNICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção de Mestra em Ecologia Aquática e Pesca.

Área de concentração: Biodiversidade

Linha de pesquisa: Conservação e impacto socioambiental sobre ecossistemas aquáticos

Orientadora: Profa. Dra. Lílian Lund Amado

Coorientador: Prof. Dr. José Ribamar da Cruz Freitas Júnior

Belém – PA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBDSistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará

Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

-
- C268i Cardoso de Carvalho, Irina Sofia.
Influência de fatores ambientais sobre respostas bioquímicas e eletrofisiológicas da ostra-do-mangue *Crassostrea gasar* (Bivalvia, Ostreidae) de duas Resex amazônicas / Irina Sofia Cardoso de Carvalho. — 2021.
81 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof^a. Dra. Lillian Lund Amado Coorientador(a): Prof. Dr. José Ribamar da Cruz Freitas Júnior
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ecologia Aquática e Pesca da Amazônia, Programa de Pós- Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, Belém, 2021.
1. Ecotoxicologia. 2. Sazonalidade. 3. Respostas antioxidantes. 4. Lipoperoxidação. 5. Parâmetros cardíacos. I. Título.


CDD 571.1

IRINA SOFIA CARDOSO DE CARVALHO

**INFLUÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS SOBRE RESPOSTAS
BIOQUÍMICAS E ELETROFISIOLÓGICAS DA OSTRA-DO-MANGUE
Crassostrea gasar (BIVALVIA, OSTREIDAE)
DE DUAS RESEX AMAZÔNICAS**

BANCA EXAMINADORA

31 / 08 / 2021


Prof.ª Dr.ª Lillian Lund Amado
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Pará-UFPA
SIAPE: 1649237

Prof.ª Dra. Lillian Lund Amado

Orientadora

(Universidade Federal do Pará – ICB)


Prof.ª Dra. Jussara Moretto Martinelli Lemos
Universidade Federal do Pará
SIAPE-2434438

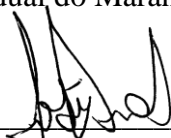
Prof.ª Dra. Jussara Martinelli Lemos

(Universidade Federal do Pará, NEAP– Membro interno)



Prof.ª Dra. Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta

(Universidade Estadual do Maranhão – Membro externo)



Prof. Dr. José Maria Monserrat

(Universidade Federal do Rio Grande – Membro externo)

Profa. Dra. Maria Auxiliadora Pantoja Ferreira
(Universidade Federal do Pará - Suplente externo)

Prof. Dr. Marcelo Petracco
(Universidade Federal do Pará – Suplente interno)

Agradecimentos

À Deus por sempre mostrar-me o melhor caminho a seguir, por ser tão maravilhoso, por todo o auxílio durante os dois anos de mestrado e por nunca desistir de mim.

À minha família (mãe, irmãos, sobrinhos, primos, tios, compadres e afilhado) saudades de todos vocês. Apesar de sete anos sem nos vermos, sempre me apoiaram e me ajudaram a realizar mais um sonho, eu não seria nada sem o apoio de todos vocês. Não vejo a hora de poder abraçar todos vocês.

À minha colega de quarto Eliane, obrigada por sempre me ouvir em todos os momentos de desabafos, minhas reclamações, cada conselho e por compartilhar comigo os meus melhores momentos. Gratidão!

À minha orientadora. Stora sete anos se passaram e ainda continuamos juntas, se não fosse a senhora por nunca desistir de mim eu já estaria em São Tomé faz tempo. Obrigada por cada palavra de conforto, pelo carinho, por sempre me ouvir quando eu preciso e obrigada por nunca me deixar desistir. Para sempre minha eterna orientadora.

Ao meu coorientador Prof. Dr. José Ribamar pelas ajudas durante as coletas, pelas contribuições e pela oportunidade e a todo o pessoal do Laboratório de Aquicultura em especial a Maria e André por toda ajuda na coleta e dissecação das ostras, sem vocês esse trabalho não seria possível.

Aos meus colegas e amigos do grupo de pesquisa Biopaq em especial, Sildiane, pela ajuda nas dosagens e na escrita da dissertação, obrigada por ser minha Coo2, agradecer também a Clayciane e a Tayná por me ajudar nas dosagens, pela partilha de conhecimento, na escrita e por cada rolê para passar o tempo, assim como gostaria de agradecer a Lindsey pelas mensagens de carinho, por me fazer rir das mensagens bobas e por praticar inglês comigo. Thank you so much darling.

À Karol minha amiga desde da graduação. Obrigada pelos sábados das aulas de inglês, pelo apoio e por cada rolê aleatório que a gente dava e dará para distrair. Thank you for everything.

A Brenda do Laboratório de Aquicultura de Espécies Tropicais pelas contribuições nas análises químicas.

Ao Prof. Dr. Moisés Hamoy pela cooperação e oportunidade.

Ao Brasil, à Belém do Pará, à Universidade Federal do Pará, ao NEAP, ao PPGEAP e aos docentes por mais uma vez me conceder a oportunidade de conquistar uma carreira acadêmica em umas das melhores instituições públicas do país e abrir novos horizontes e experiências que de outra forma não seria possível.

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

Agradeço às outras pessoas que de uma forma ou de outra tenham contribuído a para realização desse trabalho!

Epígrafe

“You fall, get up, make mistakes, learn from them, be human, and be you”

Priyanka Chopra Jonas

RESUMO

A zona costeira amazônica tem sido usada como área de intensa produção de ostras para consumo humano, devido às suas características ambientais, que favorecem o cultivo da ostra-do-mangue *Crassostrea gasar*, fato que vem contribuindo com o aumento de renda e na conservação dos estuários diminuindo a pressão sobre os estoques naturais. Estudos indicam que as ostras de regiões de cultivo são expostas à fatores ambientais extremamente variáveis como a salinidade e ciclos de maré que afetam a sua fisiologia e, por consequência, seu desenvolvimento. Nesse contexto, o objetivo geral dessa dissertação foi avaliar os efeitos dos fatores ambientais sobre as respostas de estresse oxidativo e os parâmetros cardíacos nas ostras-do-mangue *C. gasar*. A dissertação está estruturada em dois capítulos: Capítulo I) um estudo de campo, no qual se avaliou o efeito da sazonalidade sobre biomarcadores bioquímicos em órgãos da ostra-do-mangue *C. gasar* de duas regiões de cultivo localizadas em distintas porções estuarinas, em diferentes períodos sazonais e, Capítulo II) um estudo experimental, onde se caracterizou os registros basais do eletrocardiograma da ostra-do-mangue *C. gasar* e se avaliou o funcionamento cardíaco durante a imersão na água seguida de exposição atmosférica, simulando, em curto prazo, um evento de maré. No estudo de campo, as ostras foram obtidas em bancos sementeiros de duas RESEX (SISBIO N°: 71444-1) do Estado do Pará (Nazaré do Seco - NS) e (Lauro Sodré - LS). As coletas foram realizadas em períodos de nos períodos transição I (Transição seco-chuvoso; Jan/19), período chuvoso (Abr/19), transição II (Transição chuvoso-seco; Jul/19), seco (Out/19) e transição III (Transição seco-chuvoso; Jan/20). Para o experimento as ostras foram obtidas na região de Lauro Sodré, e aclimatadas em laboratório para a realização do experimento. Os biomarcadores de estresse oxidativo medidos foram a capacidade antioxidante total (ACAP), a atividade da enzima glutathione-S-transferase (GST) e a lipoperoxidação (LPO). Os parâmetros cardíacos analisados no capítulo do experimento foram a potência espectral da frequência cardíaca ($\text{mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$), amplitude (mV), frequência cardíaca em batimentos por minuto (BPM), duração do complexo QRS (s) e intervalos P-Q (s) e R-R (s). No capítulo 1, a ACAP e GST foram menores nas brânquias do período de transição I e III para ambas as áreas e aumento do LPO no período de transição III para os organismos da área I. Ocorreu aumento da ACAP no período chuvoso e diminuição do LPO na gônada. Houve diminuição da ACAP e do LPO no período de transição I na glândula digestiva. Já no músculo a ACAP se diferenciou entre os organismos das áreas I e II no período de transição I. A GST na gônada, glândula digestiva e no músculo apresentaram aumento no período de transição II. No estudo experimental, o traçado do ECG normal e regular das ostras do grupo imerso apresentou ritmo sinusal sem alterações com todas as ondas e intervalos. Já as ostras do grupo emerso, o traçado do ECG manteve o ritmo sinusal, mas com modificações nos padrões do traçado como período isoeletrico prolongado e apresentou duas fases. Na fase I a frequência cardíaca aumentou com aumento da potência e consequentemente o intervalo R-R diminuiu. Na fase II frequência cardíaca e a potência espectral diminuíram e consequentemente o intervalo R-R aumentou. O intervalo P-Q foi semelhante entre os grupos indicando que após atividade atrial o tempo para ativação ventricular é mantido nas ostras. O complexo QRS das ostras emersas diminuiu em ambas as fases em comparação ao grupo imerso. Em geral, conclui-se que as alterações bioquímicas encontradas nas ostras de ambas as áreas não foram capazes de evitar o estresse oxidativo, demonstrando que a variação sazonal, especialmente da salinidade, influencia diretamente os parâmetros de estresse oxidativo estudados nas ostras em cultivo. Os resultados do ECG ainda ilustram claramente as adaptações significativas de um bivalve para a vida em planaltos entremarés em níveis fisiológicos. Os dois resultados em conjunto reforçam a necessidade do conhecimento da influência das variáveis naturais sobre características bioquímicas e fisiológicas a fim de se otimizar o desenvolvimento dos animais em cultivo, de forma natural.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; Sazonalidade; Respostas antioxidantes, Lipoperoxidação; Parâmetros cardíacos.

ABSTRACT

The Amazon coastal zone has been used as an area of intense production of oysters for human consumption, due to its environmental characteristics, which favor the cultivation of the mangrove oyster *Crassostrea gasar*, a fact that has contributed to the increase in income and conservation of the estuaries reducing pressure on natural stocks. Studies indicate that oysters from growing regions are exposed to extremely variable environmental factors such as salinity and tidal cycles that affect their physiology and, consequently, their development. In this context, the general objective of this dissertation was to evaluate the effects of environmental factors on oxidative stress responses and cardiac parameters in *C. gasar* mangrove oysters. The dissertation is divided into two chapters: Chapter I) a field study, which evaluated the effect of seasonality on biochemical biomarkers in organs of the mangrove oyster *C. gasar* from two growing regions located in different estuarine portions, in different seasonal periods and, Chapter II) an experimental study, which characterized the basal electrocardiogram records of the mangrove oyster *C. gasar* and evaluated the cardiac function during immersion in water followed by atmospheric exposure, simulating, in short term, a tidal event. In the field study, the oysters were obtained from seed banks of two RESEX (SISBIO N°: 71444-1) in the State of Pará (Nazaré do Seco - NS) and (Lauro Sodré - LS). The samplings were carried out in periods of transition I (dry-rainy transition; Jan/19), rainy season (Apr/19), transition II (rainy-dry transition; Jul/19), dry (Oct/19), and transition III (Dry-rainy transition; Jan/20). For the experiment, the oysters were obtained in the region of Lauro Sodré, and acclimated in the laboratory to experiment. The oxidative stress biomarkers measured were total antioxidant capacity (ACAP), glutathione-S-transferase (GST) enzyme activity, and lipoperoxidation (LPO). The cardiac parameters analyzed in the chapter of the experiment were the spectral power of heart rate ($\text{mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$), amplitude (mV), heart rate in beats per minute (BPM), QRS complex duration (s), and PQ intervals (s) and RR(s). In chapter 1, ACAP and GST were lower in the gills of transition periods I and III for both areas and an increase in LPO in transition period III for organisms in area I. There was an increase in ACAP in the rainy season and a decrease in LPO in the gonads. There was a decrease in ACAP and LPO in transition period I in the digestive gland. In muscle, ACAP differed between organisms from areas I and II in transition period I. GST in the gonad, digestive gland, and muscle showed an increase in transition period II. In the experimental study, the normal ECG tracing of the oysters in the immersed group presented sinus rhythm without alterations with all waves and intervals. As for oysters from the emerged group, the ECG tracing maintained sinus rhythm, but with changes in tracing patterns such as a prolonged isoelectric period and presented two phases. In phase I, heart rate increased with increased power, and consequently, the R-R interval decreased. In phase II heart rate and spectral power decreased and consequently, the R-R interval increased. The P-Q interval was similar between groups, indicating that after atrial activity, the time for ventricular activation is maintained in oysters. The QRS complex of emerged oysters decreased in both phases compared to the immersed group. In general, it is concluded that the biochemical changes found in oysters from both areas were not able to avoid oxidative stress, demonstrating that seasonal variation, especially salinity, directly influences the oxidative stress parameters studied in oysters in culture. The ECG results still clearly illustrate the significant adaptations

of a bivalve to intertidal plateau life at physiological levels. The two results together reinforce the need for knowledge of the influence of natural variables on biochemical and physiological characteristics to optimize the development of animals in cultivation, in a natural way.

Keywords: Ecotoxicology; Seasonality, Antioxidant responses; Lipoperoxidation; Cardiac parameters

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	4
CAPÍTULO 1	9
Avaliação sazonal de parâmetros do sistema de defesa antioxidante de ostras <i>Crassostrea gasar</i> em sistemas de cultivo	9
PERGUNTA	9
HIPÓTESES	9
OBJETIVOS	9
Objetivo geral	9
Objetivos específicos	9
MANUSCRITO CIENTÍFICO	10
CAPÍTULO 2	46
Respostas cardíacas em <i>Crassostrea gasar</i> sob imersão e emersão: uma investigação experimental de como o ciclo de maré influencia o funcionamento do coração da ostra-do-mangue	46
PERGUNTA.....	46
HIPÓTESE.....	46
OBJETIVOS	46
Objetivo geral	46
Objetivos específicos.....	46
MANUSCRITO CIENTÍFICO	47
CONCLUSÕES GERAIS	65
ANEXO 1.....	66
ANEXO 2.....	68

INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento populacional mundial aumentou a demanda de alimentos nos últimos anos, forçando o setor a aumentar sua produtividade e ampliar as áreas de atuação (Oliveira et al., 2018). Um sistema promissor para suprir essa necessidade é a aquicultura, que vem se tornando um novo meio de exploração e produção de recursos aquáticos, devido a sua potencialidade de produzir alimentos de forma mais eficiente, sustentável e nutricionalmente mais rica, sendo considerada como o quarto maior sistema de produção de alimentos do mundo (FAO, 2016). Dentre os cultivos importantes da aquicultura, destaca-se o cultivo de ostras, um dos mais promissores, com uma produção de 5,1 milhões de toneladas ao redor do mundo anualmente e espera-se um aumento de consumo ainda maior até 2025 (FAO, 2020).

No Brasil, o cultivo de ostras apresenta enorme potencial de desenvolvimento, devido à extensão do litoral brasileiro junto às características oceanográficas favoráveis (da Rocha et al., 2013), tendo apresentado uma produção de 3,771t em 2011, sendo que 67% foram provenientes de cultivo e 33% da captura de espécies nativas (ICMBIO, 2013). A maior contribuição se deve à espécie da ostra japonesa, introduzida do Pacífico, *Crassostrea gigas*, cultivada principalmente no Estado de Santa Catarina (Baldan e Bendhack, 2017). Nos últimos anos, a zona costeira oriental amazônica, tem sido usada como área de intensa produção de ostras para consumo humano (Oliveira et al., 2020), devido à suas características ambientais que favorecem o cultivo de ostra-do-mangue *Crassostrea gasar*, o que vem contribuindo com o aumento de renda e na conservação dos estuários diminuindo a pressão sobre os estoques naturais (Carranza et al., 2009).

O cultivo de ostras na região se dá inicialmente pela produção de sementes, provenientes das larvas oriundas das ostras do seu próprio habitat (raízes ou pedras), que se fixam em coletores artificiais feitos de garrafa pet (Gardunho et al., 2012). Após essa fase, as ostras nas fases juvenis e de engorda, são colocadas em sistemas como *long-line* que são sistemas suspensos com lanternas mais indicados para áreas profundas e sistemas fixos também conhecido como mesa ou tabuleiro (Hoshino, 2009). Ostras cultivadas nesses sistemas são expostas à uma ampla variabilidade de fatores ambientais naturais como a salinidade (Oliveira et al., 2018) bem como a variações de marés (Letendre et al., 2009).

A salinidade é um fator exógeno que dita o sucesso do cultivo e produção das ostras em regiões estuarinas, uma vez que, apresenta variações diárias (Paixão et al., 2013) e quando a baixa afeta de forma negativa a fisiologia da ostra, diminuindo a sua taxa de filtração e de alimentação (Casas et al., 2018), conseqüentemente reduzindo o seu crescimento (Rybovich et al., 2016) e a sua produtividade (Leonhardt et al., 2017). A salinidade é um dos fatores mais estudados sobre ostras do gênero *Crassostrea*, especialmente em ambientes estuarinos, onde ocorrem variações significativas desse parâmetro (Lavaud et al., 2017; Legat et al., 2017; McCarty et al., 2020; Pantoja et al., 2020). Nesse contexto, o conhecimento sobre a tolerância e os efeitos da salinidade sobre as ostras de importância comercial é de grande relevância para o subsídio ao cultivo em larga escala (Funó et al., 2015).

Somado a esse fator, as ostras de áreas de cultivo no litoral amazônico precisam lidar com as constantes variações de maré. A zona entremarés é um dos ambientes mais desafiadores fisiologicamente, já que os organismos experimentam mudanças rápidas e drásticas nos fatores ambientais (Helmuth et al., 2006). Na região amazônica ocorrem as macromarés (Souza-Filho et al., 2009), com maré semidiurna (período de 12, 42 horas) (Miranda et al., 2012). Espécies que habitam costões rochosos entremarés, como os bivalves, podem ser sensíveis a variações da maré, ao ponto de apresentar tolerância térmica e apresentar respostas fisiológicas frente ao estresse causado pela alternância entre ambientes totalmente aquático e totalmente terrestre (Jimenez et al., 2016).

Considerando a região amazônica, que é um ecossistema altamente dinâmico, todos esses fatores abióticos juntamente com a variação sazonal da região maiores chuvas de janeiro a julho e as menores precipitações entre agosto a dezembro (Souza-Filho et al., 2009), podem gerar estresse sobre os organismos residentes e sob cultivo, como as ostras. As mudanças sazonais influenciam o metabolismo e, em caso de condições extremas provocam a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (dos Santos et al., 2019). As ERO podem ocasionar danos em macromoléculas como os lipídeos, proteínas e DNA, e levar os organismos a situação de estresse oxidativo, fazendo com que ocorra ativação de enzimas de defesas antioxidantes para neutralizar essas espécies químicas altamente reativas (Liu e Wang, 2016). Nesse sentido, essas respostas biológicas conhecidas como biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo, são comumente usadas como ferramentas de alerta precoce, para avaliar o grau do impacto na saúde dos organismos (Cajaraville et al., 2000). Os biomarcadores bioquímicos são alterações em baixos níveis de organização biológica em resposta à exposição a uma fonte estressora no

qual se analisa o grau desta condição (biomarcadores de exposição), e as suas consequências deletérias (biomarcadores de efeitos) (Giarratano et al., 2014).

Além dos biomarcadores bioquímicos, biomarcadores em nível fisiológico são também extremamente úteis na detecção precoce dos efeitos desses fatores ambientais sobre os animais. Uma ferramenta promissora nesse sentido são os registros do eletrocardiograma (ECG). O ECG consiste na captura dos impulsos elétricos que são gerados durante a pulsação do coração (Goldberger et al., 2017). O registro da forma de onda de ECG sugerido por Einthoven (Einthoven, 1912) ainda é usado atualmente (Kim et al., 2017) e tem sido empregado para detectar e monitorar doenças em humanos (Biel et al., 2001), aves (Machida e Aohagi, 2001), peixes (Cantanhêde et al., 2020) e em moluscos bivalves (Batista et al., 2015; Xing et al., 2019). Cada parte de um ECG, que corresponde a um evento elétrico específico de uma dada região do músculo cardíaco é dividido basicamente em onda P, Q, R, S e T e seus intervalos RR, QRS, ST e QT (Sheffield et al., 1969) que são as principais formas de medida usadas para diferenciar organismos saudáveis e doentes (Langheinrich et al., 2003). Logo, o ECG de ostras tem o potencial de ser uma boa ferramenta para avaliar as adaptações fisiológicas nas ostras para viver em um ambiente com frequente variação do meio.

A ostra-do-mangue *Crassostrea gasar* (Adanson, 1857) é uma espécie ecológica e economicamente importante, sendo encontrada em ambientes naturais ou em sistema de cultivo em zona entre-marés (Fernández et al., 2012), ficando emersa e exposta ao ar durante a maré-baixa e imersa com a subida da maré (Varela et al., 2007), além de lidarem com as constantes variações de salinidade (Lavaud et al., 2017). Todas essas características as tornam excelentes organismos para estudos ambientais em áreas de cultivo, frente a variação constante do ambiente.

Diante disso, o objetivo geral dessa dissertação é avaliar os efeitos dos fatores ambientais sobre as respostas antioxidantes e de estresse oxidativo e os parâmetros cardíacos nas ostras-do-mangue *C. gasar*. A dissertação é composta por dois capítulos que são apresentados em forma de artigos manuscritos científicos juntamente com a pergunta, hipótese e objetivos. O capítulo 1 é um estudo de campo e o capítulo 2 é um experimento. Em ambos os capítulos é utilizada a ostra-do-mangue *C. gasar* como organismos de estudo para avaliação das respostas antioxidantes bem como as respostas eletrofisiológicas.

Capítulo 1: “Avaliação sazonal de parâmetros do sistema de defesa antioxidante de ostras *Crassostrea gasar* em sistemas de cultivo” e será submetido para a revista *Aquaculture*, qualis A1 para biodiversidade.

Capítulo 2: “Respostas cardíacas em *Crassostrea gasar* sob imersão e emersão: uma investigação experimental de como o ciclo de maré influencia o funcionamento do coração da ostra-do-mangue” e será submetido para a revista *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, qualis A2 para biodiversidade.

REFERÊNCIAS

Baldan, A.P., Bendhack, F. Maricultura sustentável no litoral do Paraná, Brasil: atualidades e perspectivas. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 7, p. 491-497, 2017.

Barzegar, M., Kaur, G., Gavins, F.N.E., Wang, Y., Boyer, C. J., Alexander, J. S. Potential therapeutic roles of stem cells in ischemia-reperfusion injury. **Stem Cell Research**, v. 37, 101421, 2019.

Batista, F.M., Power, D.M., Harrison, A.P. Oyster Electrophysiology, Electrocardiogram Signal Recognition and Interpretation. **The Open Access Journal of Science and Technology**, v. 3, p. 1-6, 2015.

Bayne, B.L., *Marine mussels: their ecology and physiology* 1976. **Cambridge University Press, Cambridge**, v. 10, p. 506.

Biel, L., Pettersson, O., Philipson, L., Wide, P. 2001. ECG analysis: A new approach in human identification. **IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement**, 50, 808-812.

Borković-Mitić, S., Pavlović, S., Perendija, B., Despotović, S., Gavrić, J., Gačić, Z., Saičić, Z. Influence of some metal concentrations on the activity of antioxidant enzymes and concentrations of vitamin e and SH-groups in the digestive gland and gills of the freshwater bivalve *Unio tumidus* from the Serbian part of Sava River. **Ecological Indicators**, v. 32, p. 212-221, 2013.

Burnett, N.P., Seabra, R., De Pirro, M., Wethey, D.S., Woodin, S.A., Helmuth, B., Zippay, M.L., Sarà, G., Monaco, C., Lima, F.P. An improved noninvasive method for measuring heartbeat of intertidal animals. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 11, p. 91-100, 2013.

Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. **Science of the Total Environment**, v. 247, p. 295-311, 2000.

Cantanhêde, S.M., Hamoy, M., Montag, L.F. de A., Amado, L.L. Electrophysiological responses in Amazonian fish species *Bryconops caudomaculatus* (Osteichthyes: Characiformes) as biomarkers of xenobiotic toxicity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 228, 108653, 2020.

Carranza, A., Defeo, O., Beck, M. Diversity, conservation status and threats to native oysters (Ostreidae) around the Atlantic and caribbean coasts of south America. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 19, p. 344-353, 2009.

Casas, S.M., Lavaud, R., La Peyre, M.K., Comeau, L.A., Filgueira, R., La Peyre, J.F. Quantifying salinity and season effects on eastern oyster clearance and oxygen consumption rates. **Marine Biology**, v. 165, p. 1-13, 2018.

Chapperon, C., Volkenborn, N., Clavier, J., Séité, S., Seabra, R., Lima, F.P. Exposure to solar radiation drives organismal vulnerability to climate: Evidence from an intertidal limpet. **Journal of Thermal Biology**, v. 57, p. 92-100, 2016.

Connor, K.M., Gracey, A.Y. High-resolution analysis of metabolic cycles in the intertidal mussel *Mytilus californianus*. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, p. 103-111, 2012.

Connor, K.M., Gracey, A.Y. Circadian cycles are the dominant transcriptional rhythm in the intertidal mussel *Mytilus californianus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, p. 16110-16115, 2011.

da Rocha, C.M.C., de Resende, E.K., Routledge, E.A.B., Lundstedt, L.M. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.4-6, 2013.

Dhalla, N.S., Elmoselhi, A.B., Hata, T., Makino, N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. **Cardiovascular Research**, v. 47, p. 446-456, 2000.

Dong, Y. wei, Williams, G.A. Variations in cardiac performance and heat shock protein expression to thermal stress in two differently zoned limpets on a tropical rocky shore. **Marine Biology**, v. 158, p. 1223-1231, 2011.

Einthoven, W. The different forms of the human electrocardiogram and their signification. **The Lancet**, v. 179, p. 853-861, 1912.

Eltzschig, H.K., Eckle, T. Ischemia and reperfusion-from mechanism to translation. **Nature Medicine**, v. 17, p. 1391-1401, 2011.

FAO. Fishery and Aquaculture Statistics. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, p. 105, 2020.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. Contributing to food security and nutrition for all. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, v. 17, p. 1391-1401, 2016.

Fernández, B., Campillo, J.A., Martínez-Gómez, C., Benedicto, J. Assessment of the mechanisms of detoxification of chemical compounds and antioxidant enzymes in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Mediterranean coastal sites. **Chemosphere**, v. 87, p. 1235-1245, 2012.

Funo, I.C. da S.A., Antonio, Í.G., Marinho, Y.F., Gálvez, A.O. Influence of salinity on survival and growth of *Crassostrea gasar*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 41, p. 837-847, 2015.

Gardunho, D.C.L., Gomes, C.P., Tagliaro, C.H., Beasley, C.R. Settlement of an exotic oyster and other epibenthos on plastic substrates at a northern Brazilian mangrove island. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 16, p. 41, 2012.

Giarratano, E., Gil, M.N., Malanga, G. Biomarkers of environmental stress in gills of ribbed mussel *Aulacomya atra atra* (Nuevo Gulf, Northern Patagonia). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 107, p. 111-119, 2014.

Goldberger, A.L., Goldberger, Z.D., Shvilkin, A. Goldberger's Clinical Electrocardiography: A Simplified Approach: Ninth Edition. **Goldberger's Clinical Electrocardiography: A Simplified Approach: Ninth Edition**, p. 288, 2017.

Gracey, A.Y., Connor, K. Transcriptional and metabolomic characterization of spontaneous metabolic cycles in *Mytilus californianus* under subtidal conditions. **Marine Genomics**, v.30, p. 35-41, 2016.

Guimarães, A.S., Travassos, P., Souza Filho, P.W.M.E. Impact of aquaculture on mangrove areas in the northern Pernambuco Coast (Brazil) using remote sensing and geographic information system. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 828-883, 2010.

Gurr, S.J., Goleski, J., Lima, F.P., Seabra, R., Gobler, C.J., Volkenborn, N. Cardiac responses of the bay scallop *Argopecten irradians* to diel-cycling hypoxia. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 508, p. 18-29, 2018.

Helmuth, B., Mieszkowska, N., Moore, P., Hawkins, S.J. Living on the edge of two changing worlds: Forecasting the responses of rocky intertidal ecosystems to climate change. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 37, p. 373-404, 2006.

Hoshino, P. Avaliação e comparação de projetos comunitários de ostreicultura localizados no nordeste Paraense. **Universidade Federal do Pará (Dissertação Mestrado)**, p. 1-99, 2009.

Jimenez, A.G., Alves, S., Dallmer, J., Njoo, E., Roa, S., Dowd, W.W. Acclimation to elevated emersion temperature has no effect on susceptibility to acute, heat-induced lipid peroxidation in an intertidal mussel (*Mytilus californianus*). **Marine Biology**, v. 163, p. 1-10, 2016.

Kalogeris, T., Baines, C.P., Krenz, M., Korhuis, R.J. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 298, p. 229-317, 2012.

Kim, Y.G., Shin, D., Park, M.Y., Lee, S., Jeon, M.S., Yoon, D., Park, R.W. ECG-ViEW II, a freely accessible electrocardiogram database. **PLoS ONE**, v. 4, p. 1-12, 2017.

Langheinrich, U., Vacun, G., Wagner, T. Zebrafish embryos express an orthologue of HERG and are sensitive toward a range of QT-prolonging drugs inducing severe arrhythmia. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 193, p. 370-382, 2003.

Lavaud, R., La Peyre, M.K., Casas, S.M., Bacher, C., La Peyre, J.F. Integrating the effects of salinity on the physiology of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, in the northern Gulf of Mexico through a Dynamic Energy Budget model. **Ecological Modelling**, v. 363, p. 370-382, 2017.

Legat, J.F.A., Puchnick-Legat, A., Fogaça, F.H. dos S., Tureck, C.R., Suhnel, S., de Melo, C.M.R. Crescimento e sobrevivência da ostra de fundo, *Crassostrea gasar*, cultivada no nordeste e sul do Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.43, p. 172-184, 2017.

Leonhardt, J.M., Casas, S., Supan, J.E., La Peyre, J.F. Stock assessment for eastern oyster seed production and field grow-out in Louisiana. **Aquaculture**, v. 466, p. 9-19, 2017.

Letendre, J., Chouquet, B., Manduzio, H., Marin, M., Bultelle, F., Leboulenger, F., Durand, F. Tidal height influences the levels of enzymatic antioxidant defences in *Mytilus edulis*. **Marine Environmental Research**, v. 67, p. 69-74, 2009.

Letendre, J., Chouquet, B., Rocher, B., Manduzio, H., Leboulenger, F., Durand, F. Differential pattern of Cu/Zn superoxide dismutase isoforms in relation to tidal spatio-temporal changes in the blue mussel *Mytilus edulis*. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 148, p. 211-216, 2008.

Liu, X., Wang, W.X. Antioxidant and detoxification responses of oysters *Crassostrea hongkongensis* in a multimetal-contaminated estuary. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, p. 2798-2805, 2016.

Logan, C.A., Kost, L.E., Somero, G.N. Latitudinal differences in *Mytilus californianus* thermal physiology. **Marine Ecology Progress Series**, v. 450, p. 93-105, 2012.

Machida, N., Aohagi, Y. Electrocardiography, heart rates, and heart weights of free-living birds. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 32, p. 47-54, 2001.

McCarty, A.J., McFarland, K., Small, J., Allen, S.K., Plough, L. V. Heritability of acute low salinity survival in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). **Aquaculture**, v. 32, p. 47-54, 2001.

Miranda, L.B., Castro, M.C., Kjerfve, B., 2012. Princípio de oceanografia física de estuários. **Editora da Universidade de São Paulo**, 426p.

Moffitt, C.M., Cajas-Cano, L. Blue Growth: The 2014 FAO State of World Fisheries and Aquaculture. **Fisheries**, v. 39, p. 552-553, 2014.

Moyen, N.E., Somero, G.N., Denny, M.W. Impact of heating rate on cardiac thermal tolerance in the California mussel, *Mytilus californianus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 222, p. 1-17, 2019.

Oliveira, A.M.S., Baraúna, R.A., Marcon, D.J., Lago, L.A.B., Silva, A., Lusio, J., Tavares, R.D.S., Tacão, M., Henriques, I., Schneider, M.P.C. Occurrence, antibiotic-resistance and virulence of *E. coli* strains isolated from mangrove oysters (*Crassostrea gasar*) farmed in estuaries of Amazonia. **Marine Pollution Bulletin**, v. 157, p. 111-302, 2020.

Paixão, L., Ferreira, M.A., Nunes, Z., Fonseca-Sizo, F., Rocha, R. Effects of salinity and rainfall on the reproductive biology of the mangrove oyster (*Crassostrea gasar*): Implications for the collection of broodstock oysters. **Aquaculture**, v. 380-383, p. 6-12, 2013.

Pantoja, J.C.D., Oliveira, L.F.S., Ferreira, M.A.P., Silva, B.R.M., Nunes, Z.M.P., Mendes, Y.A., de Oliveira, R.S., da Rocha, R.M. Salinity and rainfall as inducers of cell proliferation and apoptosis in mangrove oyster *Crassostrea gasar* spermatogenesis. **Regional Studies in Marine Science**, v. 39, p. 101411, 2020.

Pourmozaffar, S., Tamadoni Jahromi, S., Rameshi, H., Sadeghi, A., Bagheri, T., Behzadi, S., Gozari, M., Zahedi, M.R., Abrari Lazarjani, S. The role of salinity in physiological responses of bivalves. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, p. 1548-1566, 2020.

Ramos, C. O. G., Magalhães, C.H.A.M., Santos, A.R.M., dos Melo, A.I.M., Rodrigues, C.M. Maturation of native oyster *Crassostrea gasar* at different diets in the laboratory. **Journal of Shellfish Research**, v. 33, p. 187-194, 2014.

Rybovich, M., La Peyre, M.K., Hall, S.G., La Peyre, J.F. Increased Temperatures Combined with Lowered Salinities Differentially Impact Oyster Size Class Growth and Mortality. **Journal of Shellfish Research**, v. 35, p. 101-113, 2016.

Sheffield, L.T., Holt, J.H., Lester, F.M., Conroy, D. V., Reeves, T.J. On-line analysis of the exercise electrocardiogram. **Circulation**, v. 40, p. 935-944, 1969.

Sokolov, E.P., Sokolova, I.M. Compatible osmolytes modulate mitochondrial function in a marine osmoconformer *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). **Mitochondrion**, v. 45, p. 29-37, 2019.

Solan M., Whiteley. N. Stressors in the Marine Environment.: Physiological and ecological responses; societal implications, **Stressors in the Marine Environment**, 2016.

Souza-Filho, P.W.M., Lessa, G.C., Cohen, M.C.L., Costa, F.R., Lara, R.J. The subsiding macrotidal barrier estuarine system of the Eastern Amazon Coast, Northern Brazil. **Lecture Notes in Earth Sciences**, v. 107, p. 347-375, 2009.

Varela, E.S., Beasley, C.R., Schneider, H., Sampaio, I., Marques-Silva, N.D.S., Tagliaro, C.H. Molecular phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. **Journal of Molluscan Studies**, v. 73, p. 229-234, 2007.

Willson, L.L., Burnett, L.E. Whole animal and gill tissue oxygen uptake in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*: Effects of hypoxia, hypercapnia, air exposure, and infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 246, p. 223-240, 2000.

Xing, Q., Zhang, L., Li, Yuqiang, Zhu, X., Li, Yangping, Guo, H., Bao, Z., Wang, S. Development of novel cardiac indices and assessment of factors affecting cardiac activity in a Bivalve Mollusc *Chlamys farreri*. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 1-9, 2019.

CAPÍTULO 1

Avaliação sazonal de parâmetros do sistema de defesa antioxidante de ostras *Crassostrea gasar* em sistemas de cultivo

PERGUNTA

As variações sazonais naturais podem afetar o sistema de defesa antioxidante de ostras de cultivo ao ponto de promover estresse oxidativo?

HIPÓTESES

- Ostras provenientes da reserva extrativista (RESEX) que possui uma maior flutuação em parâmetros abióticos como temperatura, pH e salinidade, apresentam maior indução do sistema de defesa antioxidante, para evitar danos oxidativos em lipídeos (lipoperoxidação);

- Períodos sazonais em que as chuvas promovem um incremento da hidrodinâmica e diminuição da salinidade (chuvoso e transição chuvoso-seco), maior turbidez e esforço para filtração podem fazer com que os organismos aumentem a sua demanda metabólica para manutenção da homeostase, tornando-as assim mais suscetíveis a danos oxidativos.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar, ao longo de um ano, o efeito da sazonalidade sobre biomarcadores de estresse oxidativo em brânquias, músculo, gônada e glândula digestiva de ostras-do-mangue *Crassostrea gasar* provenientes de duas regiões de cultivo localizadas em porções do estuário sob distintas influências do oceano.

Objetivos específicos

- Analisar a capacidade antioxidante total nas brânquias, músculo, gônada e glândula digestiva, de ostras provenientes de duas RESEX amazônicas, ao longo dos períodos sazonais da região durante um ano;

- Determinar a atividade da enzima glutathione-S-transferase (GST) nas brânquias, músculo, gônada e glândula digestiva, de ostras de cultivo oriundas de duas RESEX amazônicas, ao longo dos períodos sazonais da região, durante um ano.

- Avaliar a lipoperoxidação em músculo, brânquias, glândula digestiva e gônada de ostras de cultivo oriundas de duas RESEX amazônicas, ao longo dos períodos sazonais da região, durante um ano.

MANUSCRITO CIENTÍFICO

Avaliação sazonal de parâmetros do sistema de defesa antioxidante de ostras *Crassostrea gasar* em sistemas de cultivo em reservas extrativistas na Amazônia

Irina Sofia Cardoso de Carvalho^{abc}, Sildiane Martins Cantanhêde^{bc}, Clayciane Santos do Nascimento^{bc}, Tayná Araújo dos Santos^{bc}, José Ribamar da Cruz Freitas Júnior^d, Lílian Lund Amado^{abc*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, Núcleo de Ecologia Aquática e Pesca da Amazônia, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, Brasil.

^bLaboratório de Ecotoxicologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, Brasil.

^cLaboratório de Pesquisa em Monitoramento Ambiental Marinho, Instituto de Geociências, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, Brasil.

^dLaboratório de Aquicultura, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Castanhal-PA, Brasil.

*Autor para correspondência: Lílian Lund Amado. E-mail: lilian.amado@gmail.com; lla@ufpa.br; Telefone: +55 91 991765500. Laboratório de Ecotoxicologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. Av. Augusto Corrêa, 01, Guamá, 66075110. Belém, Pará, Brasil.

Resumo

Parâmetros ambientais variáveis, influenciam no cultivo dos moluscos bivalves. Mudanças sazonais marcantes provocam alterações na reprodução, crescimento e fisiologia, afetando principalmente o equilíbrio osmótico de organismos aquáticos em geral, essencialmente os sésseis. A influência da sazonalidade junto às respostas dos biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo foram analisadas em amostras de ostras de ostra-do-mangue (*Crassostrea gasar*) coletadas em diferentes períodos hidrológicos em sítios de cultivo da zona costeira da Amazônia que estão sujeitos a fortes variações sazonais de precipitação e influência de maré. Espécimes de *C. gasar* foram obtidos com coletores artificiais em dois bancos sementeiros durante a baixa-mar em duas Resex (SISBIO N^o: 71444-1): NS- Reserva Extrativista Marinha de Maracanã, (Vila de Nazaré do Seco) e LS- Reserva Extrativista Mãe Grande de Curuçá (Vila de Lauro Sodré). As coletas foram realizadas durante um ano nos períodos transição I, chuvoso, transição II, seco e transição III. Foram analisados biomarcadores bioquímicos de exposição: capacidade antioxidante total (ACAP), atividade da enzima glutationa S-transferase (GST); e de efeito: lipoperoxidação (TBARS). Os dados abióticos obtidos demonstram que a temperatura e o pH mantiveram-se constantes entre os locais de coleta, variando de forma homogênea ao longo do ano. A salinidade variou entre as áreas e entre os períodos sazonais. Os dados biométricos indicam que as ostras obtidas na região de NS foram maiores e mais pesadas do que as ostras cultivadas na região de LS. Nas brânquias e na glândula digestiva observou-se diminuição da ACAP e GST no período chuvoso-seco (transição I e III) e aumento do LPO durante o período de transição III para ambas as áreas. Observou-se diferença da ACAP entre as áreas durante o período de transição I e II na gônada e apenas no período de transição I para o músculo onde as ostras de LS obtiveram menores valores de competência antioxidante. Houve aumento da GST na gônada e no músculo durante o período de transição II nos organismos de ambas as regiões de cultivo. Ocorreu diminuição do LPO na gônada no período de transição I em relação ao período seco e transição III para ambas as áreas. Os resultados indicam que as variações sazonais de salinidade afetam, de forma diferenciada, os parâmetros de estresse oxidativo analisados nas distintas populações de ostras em cultivo estudadas, havendo diminuição da resposta dos biomarcadores durante o período de transição seco-chuvoso nas duas regiões.

Palavras-chave: estuário; estresse oxidativo; salinidade; cultivo; sazonalidade; bivalves

1. Introdução

As ostras do gênero *Crassostrea* são encontradas naturalmente em ambientes estuarinos tropicais, fixadas em substratos, tendo como habitat principal raízes do mangue (Varela et al., 2007). A extração desse molusco constitui uma importante fonte de alimento e renda para populações costeiras (Pereira et al., 2001). O cultivo desse molusco vem crescendo em nível mundial, comprovada pelos dados estatísticos da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO, 2020). O processo de produção de ostras gera renda e contribui para conservação dos estuários, diminuindo a pressão sobre os estoques naturais, deste modo, possibilitando a exploração mais sustentável (Carranza et al., 2009).

No Brasil, essa prática concentra-se na região de Santa Catarina onde o clima frio favorece a criação da espécie exótica *Crassostrea gigas*, onde a mesma teve melhor adaptação, devido a baixas temperaturas (Baldan e Bendhack, 2017). Nos manguezais amazônicos o clima local quente e úmido, devido a influência de fatores permanentes e sazonais como estações seca e chuvosa, favorece o cultivo de ostras-do-mangue *Crassostrea gasar* (Lameira Silva et al., 2020a). O cultivo desta espécie foi adotado pela maior parte dos produtores, pelo fato de ser a espécie que atinge o maior tamanho em relação as outras do seu gênero (Pereira et al., 2003) e tolerar variações de temperatura e salinidade (Lopes et al., 2013; Yang et al., 2016).

Geralmente, as ostras demonstram ser tolerantes à variações ambientais e cada espécie apresenta a sua especificidade de respostas frente a flutuações de parâmetros naturais (Valenzuela-Castillo et al., 2015; Li et al., 2018). Contudo, diversos estudos têm evidenciando que variações físico-químicas podem afetar o assentamento das larvas (Legat et al., 2017), o desenvolvimento (Horodesky et al., 2019), o ciclo reprodutivo (Paixão et al., 2013; Gomes et al., 2014), bem como o formato das conchas (Oliveira et al., 2020) desses animais. Desta forma, variáveis físico-químicas da água especialmente a salinidade, podem alterar as respostas fisiológicas nos moluscos bivalves, interferindo na taxa de filtração, no consumo de oxigênio absorção de nutrientes e no seu equilíbrio osmótico provocando gasto energético (Yang et al., 2016) para reajustar a concentração de sais e água no organismo.

Para lidar com as constantes variações do seu habitat natural, os organismos estuarinos utilizam estratégias comportamentais e fisiológicas para manter a homeostase (Foster et al., 2010). Os moluscos bivalves são osmoconformadores, regulando a concentração de seus fluidos intracelulares frente a mudanças do meio (Sokolov e Sokolova, 2019). Desse modo, mudanças osmóticas no meio afetam diretamente o funcionamento metabólico, á que a regulação osmótica

é extremamente custosa em termos de energia (Urbina e Glover, 2015). Processos que demandam aumento de energia favorecem a produção de espécies reativas de oxigênio ((Rivera-Ingraham e Lignot, 2017). O aumento de ERO na célula, desencadeia a ativação de vias de proteção, através do sistema de defesa antioxidante (SDA) (Alves de Almeida et al., 2007). Caso essa indução do SDA não seja suficiente frente ao conteúdo de ERO geradas metabolicamente, danos em macromoléculas como lipídios (lipoperoxidação), proteínas (oxidação de proteínas) e DNA (quebras e oxidação) podem ocorrer (Chan e Wang, 2018).

Dessa forma, para minimizar os feitos causados pelas ERO, os organismos desenvolveram defesas antioxidantes, que utilizam tanto a ação de moléculas enzimáticas como a glutathione-S-transferase (GST), como também de moléculas não enzimáticas como a glutathione reduzida (GSH) (Faggio et al., 2018; Magara et al., 2019). Por esse motivo, a avaliação das respostas antioxidantes e os níveis de peroxidação lipídica tem sido utilizadas para avaliar os efeitos das variáveis físico-químicas em bivalves em estudos de monitoramento (De Almeida et al., 2004). Estudos têm demonstrado que as ostras, apesar de relativamente adaptadas às variações naturais do ecossistema estuarino, são sensíveis a mudanças ambientais sejam elas naturais ou antropogênicas (Oliveira et al., 2018; Horodesky et al., 2019; Usese et al., 2019; Ferreira et al., 2020; dos Santos et al., 2021).

Diante disso, o presente estudo visa avaliar a influência da sazonalidade em biomarcadores bioquímicos associados ao estresse oxidativo em amostras de ostra de mangue (*C. gasar*), mantidas em sistemas de cultivo, em diferentes períodos hidrológicos ao longo de um ano, em sítios de cultivo da zona costeira da Amazônia Oriental que estão sujeitos a fortes variações sazonais de precipitação.

2. Material e Métodos

2.1 Declaração de ética

Esta pesquisa segue os requisitos estabelecidos pelo Brasil para atividades de usos científicos em áreas de preservação com autorização (Nº 71444-1), de acordo com a Instrução Normativa nº3, de 1 de setembro de 2014, do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade/Ministério do Meio Ambiente.

2.2 Área de estudo e desenho amostral

A área do estudo está localizada na zona estuarina, a leste da foz do Rio Amazonas que é caracterizada por ser uma costa de submersão rodeada por grandes números de estuários e baías. O clima é tropical chuvoso (~3000 mm anuais), quente (média de 27,7 °C) e úmido (umidade entre 80 e 85%), sujeito a macromarés semidiurnas (de até 5m) (Souza-Filho et al. 2009). A região sofre influência das Zonas de Convergência Intertropical e associada a linhas de instabilidade que define os períodos de maiores chuvas de janeiro a julho e as menores precipitações entre agosto a dezembro (Berrêdo et al., 2008; Souza-Filho et al., 2009; Batista et al., 2015). Todas essas particularidades ambientais auxiliam no aumento da produtividade e criação de atividades de aquicultura, como o cultivo de moluscos (Pinto-Coelho e Havens, 2015). Dado a isso, diversas comunidades locais instalaram sítios de cultivos de ostras em diferentes estuários da região amazônica (Oliveira et al., 2018).

Duas dessas áreas no Estado brasileiro do Pará foram selecionadas para o presente estudo, com diferentes níveis de salinidade e distâncias entre os sítios de cultivos e o oceano: NS, localizada no Rio Maracanã, município de Maracanã (00° 39' S e 47° 34' W), representando uma distância intermediária do mar, de aproximadamente 15 km (estuário inferior em relação ao segundo ponto), inserida na Resex Extrativista de Maracanã, dentro da Resex, há uma vila (Nazaré do Seco - NS) com alguns moradores praticando ostreicultura (Fig.1). LS, localizada no Rio Tijoca, (00° 50' S e 47° 53' W), Município de Curuçá com uma distância de aproximadamente 25 km do mar (estuário superior em relação ao primeiro ponto) inserida na Reserva Extrativista Marinha Mãe Grande de Curuçá, estando a vila (Lauro Sodré - LS) dentro da Resex com alguns moradores praticando ostreicultura.

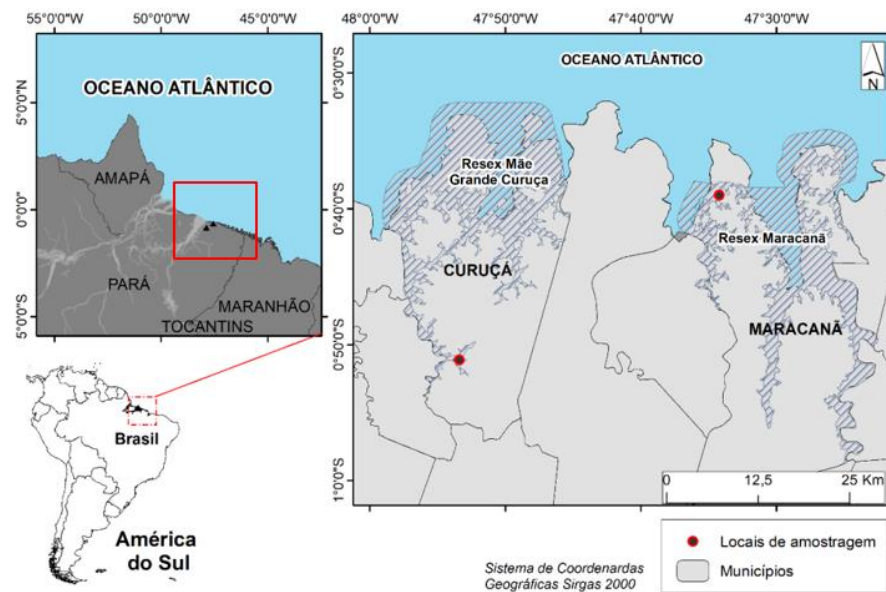


Figura 1: Localização das duas áreas de estudos no Estado do Pará: NS (Nazaré do Seco) Estuário do Rio Maracanã (Município de Maracanã), LS (Lauro Sodrê): Estuário do Rio Tijoca (Município de Curuçá).

2.3 Obtenção das ostras e coleta de água

As coletas ocorreram trimestralmente ao longo de um ano sendo: Período transição I (Transição seco-chuvoso, janeiro/2019), período chuvoso (abril/2019), transição II (Transição chuvoso-seco, julho /2019), seco (outubro /2019) e transição III (Transição seco-chuvoso, janeiro /2020). Os meses de coleta foram escolhidos baseados em dados de precipitação pluviométrica obtidos da estação do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), localizada na cidade de Salinópolis que fica aproximadamente 80 km das Resex (Figura 2).

Espécimes de *Crassostrea gasar* (150 exemplares) foram obtidos dos coletores artificiais em dois bancos sementeiros durante a baixa-mar. É importante ressaltar que, apesar da coleta ter ocorrido em maré baixa, os organismos foram coletados totalmente submersos na água, não tendo experimentado exposição aérea nos momentos que antecederam a coleta. Logo em seguida, as ostras foram acondicionadas em caixa com gelo de modo a minimizar o estresse e preservar as características metabólicas das mesmas. Foi priorizado dentro do esforço da coleta ostras adultas e consideradas prontas para a comercialização pelos produtores locais. No laboratório de Laboratório Aquicultura do IFPA (Campus Castanhal) os animais foram mensurados com um paquímetro (0,01 mm), sendo as dimensões registradas: a maior largura das valvas em vista frontal, comprimento e altura das valvas. Os animais também foram pesados

(peso total) em balança semi-analítica (0,01g). Foram retiradas as brânquias, porções do músculo adutor, glândula digestiva e gônada e em seguida adicionados em tubos tipo eppendorf armazenados em nitrogênio líquido e encaminhadas ao Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal do Pará (PA) para armazenamento em ultra freezer (80 °C) até as análises bioquímicas e metais.

Amostras de água foram coletadas em frascos de polietileno refrigeradas e encaminhadas para análise de pH e salinidade com sonda multiparamétrica (Hanna-HI 9828). A temperatura foi medida *in situ*.

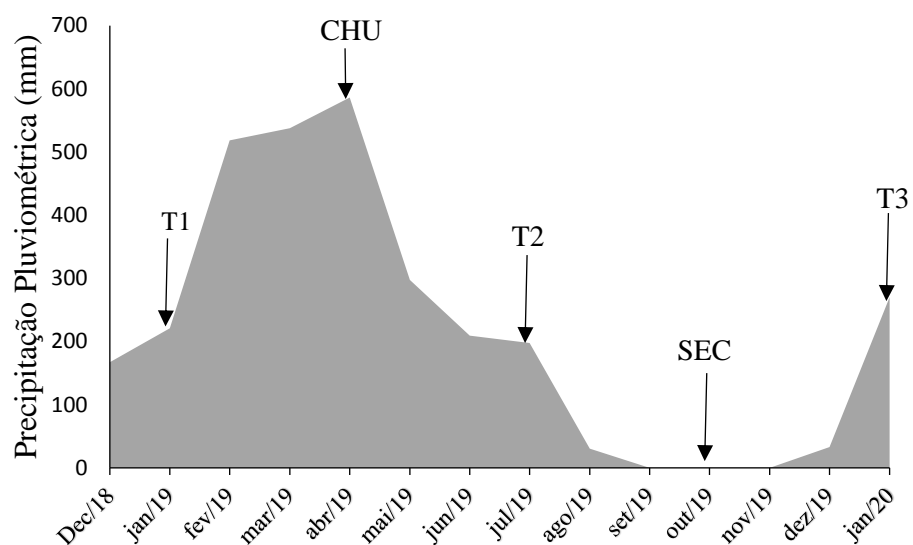


Figura 2: Precipitação mensal em milímetros (mm). Dados da estação A 215 do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) em Salinópolis, localizada a aproximadamente 80KM dos pontos de coleta. T1= Transição I, CHU= chuvoso, T2= transição II, SEC= seco e T3= transição III.

2.4 Análise de biomarcadores de estresse oxidativo

As brânquias, gônada, glândula digestiva e músculo (aproximadamente 150 mg cada) foram homogeneizadas individualmente para as medições das atividades enzimáticas em tampão resfriado (20 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, Sacarose 500 mM, KCl 150 mM, DTT 1 mM e PMSF 0,1 mM) com pH 7.6 e na proporção 1:4 (P/V), segundo o método de (Bainy et al. (1996). Os homogeneizados foram centrifugados a 20.000 x g por 20 min a 4 °C. Os sobrenadantes resultantes foram aliqüotados e mantidos a -80 °C até o momento das dosagens.

O conteúdo de proteínas foi medido com kit comercial (Doles LTDA, Brasil), baseado no teste de Biureto (citrato trissódico 0,114M, carbonato de sódio 0,21M e sulfato de cobre

0,01M) para proteínas, as leituras foram realizadas em leitor de microplacas multimodal (Victor X3, Perkin Elmer) a 550 nm. Os resultados foram expressos em miligramas de proteínas/mL.

A medição da capacidade antioxidante total foi seguindo o método de Amado et al., (2009), por fluorometria com detecção a 530nm utilizando 2'2'- azobis-2-metilpropilamida dihidroclorato (ABAP, 4nM) como substrato. As ERO são detectadas nas amostras dos órgãos com e sem exposição a um gerador de radicais peroxil pela decomposição térmica do 2'2'- azobis-2-metilpropilamida dihidroclorato (ABAP, 4 mM) a 37 °C. A geração de fluorescência total (485 e 530 para excitação e emissão respectivamente) foi calculada pela integração da unidade de fluorescência (UF) durante o período de leitura após ajustar os dados de UF para uma função polinomial a de segunda ordem. A área relativa entre as áreas com ABAP e sem ABAP é o inverso da diferença dividida pela área sem ABAP, consideradas como medida da capacidade antioxidante total, onde o tamanho da área significa capacidade antioxidante, onde a baixa fluorescência será obtida após adição de ABAP, indicando alta competência para neutralizar radicais peroxil. Os resultados estão expressos como inverso da área relativa.

O método para análise da atividade da glutathione-S-transferase (GST) baseia-se na conjugação de 1mM glutathione reduzida (GSH) com o substrato 1-cloro-2,4-clorodinitrobenzeno (CDNB) catalisada pela GST presente na amostra, produzindo um composto que é detectado em 340 nm ($\epsilon = 9.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado (Habig e Jakoby, 1981). O ensaio enzimático foi realizado em tampão fosfato (KH_2PO_4) 0,05M, pH 7,0 contendo 50 mM CDNB. Como substrato iniciador foi utilizada GSH 10 mM. Desta atividade é descontada a reação basal obtida pela leitura da reação entre a GSH do ensaio e o CDNB, sem a presença da amostra. A absorbância basal foi descontada a partir da leitura da reação do ensaio na ausência da amostra. Os resultados são expressos em unidade de GST, uma unidade definida como a quantidade necessária de enzima para conjugar 1 μ mol de CDNB com GSH em 1 min por mg de proteína, à 25°C em pH 7,00.

A lipoperoxidação (LPO) foi determinada pela quantificação do produto formado pela reação de malondialdeído (MDA) e o ácido tiobarbitúrico (TBA), de acordo com Oakes e Van Der Kraak (2003). Resumidamente, o homogeneizado foi misturado com ácido tiobarbitúrico a 0,8% (TBA), solução de ácido acético a 20%, 8,1 %) de decilsulfato de sódio (SDS), água destilada e 7,6% de hidroxitolueno butilado (BHT). A mistura foi aquecida em banho-maria em

95°C durante 30 min e o derivado colorimétrico é extraído com n-butanol. Depois disso, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min e a absorvância do sobrenadante 515 nm (emissão) após excitação 553 nm foi medida e calibrada através da curva padrão MDA. Os resultados foram expressos em nmol/g de tecido úmido.

2.5 Análise estatística

Foram testados os pressupostos de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (teste de Levene) nos dados dos biomarcadores para posterior aplicação da análise de variância (ANOVA-*two way*) com teste post-hoc de Tukey. Quando os pressupostos da análise paramétrica não foram alcançados, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi aplicado para comparação de biomarcadores entre os locais de coleta e entre períodos sazonais com o teste subsequente de comparação múltipla de classificações médias. Para comparação entre os períodos climáticos, locais e dados biométricos, também foram testados os pressupostos de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (teste de Levene). Logo em seguida, foi realizada uma análise de variância (ANOVA- *two way*) com teste de Tukey à posteriori. O nível de significância adotado foi de 5% (Zar 1984).

3. Resultados

3.1 Parâmetros físico-químicos da água

No período chuvoso (abril/2019), ocorreu o maior valor de precipitação com 586 mm enquanto que o período seco (outubro/2020) não choveu. Nos períodos de transição os valores foram de: transição I (janeiro/ 2019): 221; transição II (julho/2019): 197 e transição III (janeiro/2020): 270 mm (Tabela 1). A temperatura manteve-se constante em todos os períodos amostrados, mantendo-se em torno de 26,2 a 27 °C (Tabela 1). Ambos os pontos apresentaram os maiores valores de pH no período de transição I e menores valores no período de transição III. Observou-se diminuição do pH do período de transição II para o chuvoso e do período seco para transição III (Tabela 1). No período seco o pH manteve-se levemente alcalino (NS: 7,8 e LS: 7,3).

A salinidade (Tabela 1) apresentou variação tanto entre os locais como entre os períodos sazonais amostrados. Ambas as áreas apresentaram valores de salinidade 0 no período chuvoso. No período de transição II a região de Lauro Sodré (LS: região mais afastada do oceano) permaneceu com valores mínimos de salinidade 0 e Nazaré do Seco (NS: região mais próxima do oceano) apresentou incremento de salinidade para 10. Resultado oposto foi encontrado durante o período de transição III, onde a salinidade de NS foi de 4,9 e LS foi de 8. Os maiores

valores de salinidade foram registrados durante o período seco, para ambas as áreas. Observa-se assim uma relação inversa entre os valores de salinidade e precipitação pluviométrica, na qual os períodos de maior precipitação apresentaram menores valores de salinidade, enquanto os períodos de baixa pluviosidade apresentaram aumento nos valores de salinidade.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos da água. Os locais de coleta Nazaré do Seco e Lauro Sodré são definidos pela sigla NS (NS) e LS (LS) respectivamente. A pluviosidade como a média de chuvas em milímetro. A temperatura na sigla TEMP é expressa em °C e salinidade expressa na sigla SAL.

PERÍODO	PLUVIOSIDADE (mm)	LOCAL	TEMP (°C)	pH	SAL.
TRANSIÇÃO I	221	NS	26,2	8,8	8
		LS		8,3	9
CHUVOSO	586,2	NS	26,7	6,7	0
		LS		6,3	0
TRANSIÇÃO II	197,6	NS	27,2	7,4	10
		LS		8	0
SECO	0	NS	27	7,8	18,7
		LS		7,3	15,5
TRANSIÇÃO III	270	NS	26,3	6,5	4,9
		LS		6,2	8,2

3.3 Biometria

Os organismos de Nazaré do Seco (NS: região mais próxima do oceano) e Lauro Sodré (LS: região mais afastada do oceano) diferenciaram-se em relação ao comprimento total (CT) em todos os períodos amostrados, com exceção do período seco (Tabela 2). As ostras de NS apresentaram maior CT em comparação às de LS nos períodos de transição I (NS: 5.9 ± 0.1 ; LS: 5.0 ± 0.1 cm), e transição II (NS: 8.0 ± 0.2 ; LS: 7.5 ± 0.1 cm). No período chuvoso (NS: 4.9 ± 0.1 ; LS: 5.9 ± 0.2 cm) e transição III (NS: 7.8 ± 0.2 ; LS: 9.2 ± 0.1 cm) o resultado foi inverso, onde os organismos de LS foram estatisticamente maiores (Tabela 2). Observou-se um padrão de diferença do CT nas ostras de ambas as regiões de cultivo na qual, os animais do período de transição I e do período chuvoso apresentaram menores valores do CT.

Ostras de NS coletadas no período de transição II (8.0 ± 0.2 cm), não apresentaram diferenças no comprimento total entre os indivíduos do período seco (8.3 ± 0.2 cm) e transição III (7.8 ± 0.2 cm) (Tabela 2). Já em LS os organismos do período de transição II (8.0 ± 0.2 cm) apresentaram diferença em relação às ostras do período seco (8.5 ± 1.1 cm) e do período de transição III (9.2 ± 0.1 cm), sendo os dois últimos com maiores valores de CT (Tabela 2). Animais do período seco não apresentaram diferença estatística com os organismos do período de transição III ($p > 0,05$). Ostras de ambas as áreas diferiram na largura das conchas (LC), nos

períodos de transição II (NS: 3.3 ± 0.1 ; LS: 2.6 ± 0.1 cm) e no período seco (NS: 6.3 ± 0.2 ; LS: 2.8 ± 0.1 cm) (Tabela 2) onde as ostras da região de Nazaré do Seco apresentaram os maiores valores.

Organismos obtidos em NS no período seco (6.1 ± 0.2 cm) foram estatisticamente maiores em relação aos demais períodos sazonais na LC. Indivíduos dos demais períodos sazonais transição I (3.7 ± 0.1 cm), chuvoso (3.2 ± 0.1 cm), transição II (3.4 ± 0.1 cm) e transição III (3.2 ± 0.1 cm) se assemelharam em relação a LC (Tabela 2). Para LS, os indivíduos obtidos no período de transição I (3.3 ± 0.1 cm) foram significativamente maiores na LC em comparação aos indivíduos obtidos no período de transição II (2.6 ± 0.1 cm) e período seco (2.8 ± 0.1 cm), no entanto os mesmos não apresentaram diferença de valores da LC em relação as ostras obtidas no período chuvoso (3.4 ± 0.1 cm) e transição III (3.2 ± 0.1 cm) (Tabela 2). Organismos obtidos no período de transição II (2.6 ± 0.1 cm) apresentaram semelhança nos valores de LC com os indivíduos do período seco (2.8 ± 0.1 cm) do mesmo modo que, os organismos do período seco se assemelharam com os do período de transição III (3.2 ± 0.1 cm) (Tabela 2).

Para altura da concha (AC) observou-se diferença entre as áreas nos organismos do período chuvoso (NS: 6.9 ± 0.2 ; LS: 8.0 ± 0.2 cm), seco (NS: 4.6 ± 0.2 ; área: 6.1 ± 0.1 cm), nas quais os organismos de LS foram significativamente maiores e no período de transição II (NS: 5.9 ± 0.2 ; LS: 4.7 ± 0.3 cm) as ostras de NS apresentaram maiores valores de AC (Tabela 2). Na região de Nazaré do Seco os indivíduos obtidos no período de transição I (8.5 ± 0.2 cm) obtiveram maiores valores de AC em comparação aos animais dos demais períodos sazonais ($p < 0,05$), já as ostras do período seco da mesma área apresentaram menores valores de AC em relação aos demais períodos ($p > 0,05$). Ostras obtidas no período chuvoso (6.9 ± 0.2 cm) também se diferenciaram dos animais do período de transição II (5.9 ± 0.2 cm) e III (5.6 ± 0.1 cm), apresentando valores estatisticamente maiores (Tabela 2).

No que concerne os valores da AC para os animais da região de Lauro Sodré, observou-se que as ostras do período de transição I (8.6 ± 0.2 cm) foram significativamente maiores em comparação aos indivíduos do período de transição II (4.7 ± 0.3 cm), seco (5.9 ± 0.1 cm) e transição III (5.8 ± 0.1 cm) contudo, os mesmos apresentaram semelhança nos valores de AC com os animais do período chuvoso (8.0 ± 0.2 cm) (Tabela 2). Ostras do período de transição II apresentaram menores valores de AC em comparação aos demais períodos sazonais ($p > 0,05$). Já os animais do período seco (5.9 ± 0.1 cm) apresentaram semelhança na altura com os indivíduos obtidos do período de transição III (Tabela 2).

O peso total (PT) das ostras foi diferente entre as áreas, exceto no período de transição III. Os animais obtidos em NS foram significativamente maiores em relação aos animais de LS nos períodos de transição I (NS: 118.5±106.0; LS: 89.9±72.6 g) e II (NS: 86.9±79.9; LS: 53.4±48.0 g), e no período seco (NS: 91.0±69.4; LS: 71.6±62.2 g). Resultado inverso foi encontrado nos animais coletados no período chuvoso (NS: 80.0±72.0; LS: 110.9±101.1 g) onde as ostras obtidas em LS foram mais pesadas em relação a NS (Tabela 2). Ostras de NS obtidas no período de transição I (118.5±106.0 g), foram mais pesadas em comparação aos organismos do período chuvoso (80.0±72.0 g), transição II (86.9±79.9 g) e transição III (88.3±84.5 g) (Tabela 2). Contudo, as do período de transição I, apresentaram semelhança no PT com os animais do período seco ($p>0,05$). A mesma semelhança de PT foi encontrada entre os indivíduos do período chuvoso, transição II e III (Tabela 2).

Organismos obtidos em LS, no período de transição I (89.9±72.6 g) foram significativamente mais pesados, que os indivíduos do período de transição II (53.4±48.0 g) (Tabela 2). Todavia, os animais do período de transição I apresentaram semelhança nos valores de PT com os indivíduos do período de seco e transição III ($p>0,05$) (Tabela 2). Organismos do período chuvoso (110.9±101.1 g) foram mais pesados do que os indivíduos do período de transição II (53.4±48.0 g), seco (71.6±62.2 g) e transição III (82.6± 76.7 g). Observou-se semelhança nos valores do PT entre os organismos do período de transição I, seco e transição III ($p>0,05$).

Tabela 2: Biometria de *Crassostrea gasar* para todos os locais amostrados ao longo do ciclo hidrológico anual, (n= 15). NS=Nazaré do Seco (NS), LS=Lauro Sodré (LS). O comprimento total (CT), largura da concha (LC) e altura da concha (AC) estão expressas em (cm), com média±erro padrão. Os pesos totais (PT) dos animais estão expressos em (g), com mediana±quartil. As letras minúsculas diferentes representam diferença ($p<0,05$) entre os pontos por período e letras maiúsculas diferentes representam diferença ($p<0,05$) entre os períodos para um mesmo local.

PERÍODO	LOCAL	CT (cm)	LC (cm)	AC (cm)	PT (g)
TRANSIÇÃO I	NS	5.9± 0.1 Aa	3.7±0.1 Aa	8.5±0.2 Aa	118.5±106.0 Aa
	LS	5.0±0.1 Ab	3.3±0.1 Aa	8.6±0.2 Aa	89.9±72.6 ACb
CHUVOSO	NS	4.9±0.1 Ba	3.2±0.1 Aa	6.9±0.2 Ba	80.0±72.0 Ba
	LS	5.9±0.2 Bb	3.4±0.1 Aa	8.0±0.2 Ab	110.9±101.1 Cb
TRANSIÇÃO II	NS	8.0±0.2 Ca	3.4±0.1 Aa	5.9±0.2 Ca	86.9±79.9 Ba
	LS	7.5±0.1 Cb	2.7±0.1 Bb	4.7±0.3 Bb	53.4±48.0 Bb
SECO	NS	8.3±0.2 Ca	6.1±0.2 Ba	4.6±0.2 Da	91.0±69.4 Aa
	LS	8.5±1.1 Da	2.8±0.1 Bb	5.9±0.1 Cb	71.6±62.2 ABb
TRANSIÇÃO III	NS	7.8±0.2 Ca	3.2±0.1 Aa	5.6±0.1 Ca	88.3±84.5 Ba
	LS	9.2±0.1 Db	3.2±0.1 ABa	5.8±0.1 Ca	82.6± 76.7 ABa

3.4 Biomarcadores

3.4.1 Brânquias

A capacidade antioxidante total (ACAP) nas brânquias dos organismos das duas áreas diferenciaram-se no período chuvoso (NS: $0,16 \pm 0,02$; LS: $0,09 \pm 0,02$) e transição II (NS: $0,13 \pm 0,006$; LS: $0,08 \pm 0,006$), onde as ostras de NS mantiveram maiores valores de competência antioxidante em comparação aos organismos de LS (Fig. 3 a). Já nos períodos de transição I (NS: $0,08 \pm 0,008$; LS: $0,06 \pm 0,005$), seco (NS: $0,11 \pm 0,006$; LS: $0,08 \pm 0,007$) e transição III (NS: $0,05 \pm 0,005$; LS: $0,04 \pm 0,005$) ($p > 0,005$) os organismos coletados nas duas áreas não se diferenciaram em termos de competência antioxidante no tecido branquial (Fig. 3 a). Observou-se um padrão de aumento da competência antioxidante nas brânquias dos organismos de ambas as áreas no período de transição I para o chuvoso, e manutenção ao longo de transição II e seco, já no período de transição III ambas as regiões apresentaram diminuição da ACAP no tecido branquial em comparação aos demais períodos sazonais (Fig. 3 a).

A atividade da glutathione-S-transferase (GST) nas brânquias das ostras foi semelhante entre os organismos de NS e LS em todos os períodos sazonais (Fig. 3 b). Observou-se um padrão de menor atividade da GST nas brânquias dos organismos das duas áreas no período de transição I (NS: $4,28 \pm 0,46$; LS: $2,61 \pm 0,32$ UGST/mg de proteína) em comparação aos demais períodos. Resultado oposto foi encontrado em ambas as áreas onde as brânquias dos animais do período de transição II, apresentaram aumento da atividade da enzima em comparação as brânquias dos indivíduos de transição I e III (Fig. 3 b). Todavia, as brânquias das ostras amostradas no período de transição II ($13,04 \pm 1,68$ UGST/mg de proteína) apresentaram semelhança da GST com as do período de período seco ($9,66 \pm 0,60$ UGST/mg de proteína) para NS e apresentaram aumento da enzima em relação as brânquias organismos do período seco ($9,42 \pm 0,76$ UGST/mg de proteína) para LS (Fig. 3 b).

A lipoperoxidação (LPO) em brânquias não apresentou diferenças significativas entre os organismos coletados nas distintas áreas para nenhum dos períodos sazonais (Fig. 3c). Quando comparamos as variações sazonais do LPO entre períodos para um mesmo ponto, verificamos algumas diferenças. Brânquias das ostras obtidas em NS no período de transição I ($0,08 \pm 0,07$ nMol MDA/g de tecido úmido) apresentaram semelhança no conteúdo dos lipídeos peroxidados com as brânquias dos animais do período chuvoso ($0,08 \pm 0,06$ nMol MDA/g de tecido úmido), transição II ($0,10 \pm 0,06$ nMol MDA/g de tecido úmido) e período seco ($0,16 \pm 0,14$ nMol MDA/g de tecido úmido) (Fig. 3c). No entanto, as brânquias das ostras do

período de transição I apresentaram diferença no LPO com os animais do período de transição III ($0,29 \pm 0,20$ nMol MDA/g de tecido úmido) no mesmo ponto de amostragem, sendo o último período com maior teor de lipídeos peroxidados. Por outro lado, ostras do período chuvoso apresentaram menor conteúdo de lipídeos no tecido branquial em comparação ao LPO das brânquias dos organismos do período seco e transição III ($p > 0,005$) (Fig. 3 c).

Para LS as brânquias dos animais obtidos no período de transição I ($0,11 \pm 0,06$ nMol MDA/g de tecido úmido) apresentaram semelhança nos conteúdos de lipídeos com as brânquias das ostras amostradas no período I ($0,05 \pm 0,02$ nMol MDA/g de tecido úmido), II ($0,13 \pm 0,06$ nMol MDA/g de tecido úmido) e transição III ($0,16 \pm 0,11$ nMol MDA/g de tecido úmido) (Fig. 3c). No entanto, observou-se que as brânquias das ostras obtidas no período seco ($p < 0,005$) apresentaram maior lipídeos peroxidados em relação aos dos organismos do período de transição I e chuvoso.

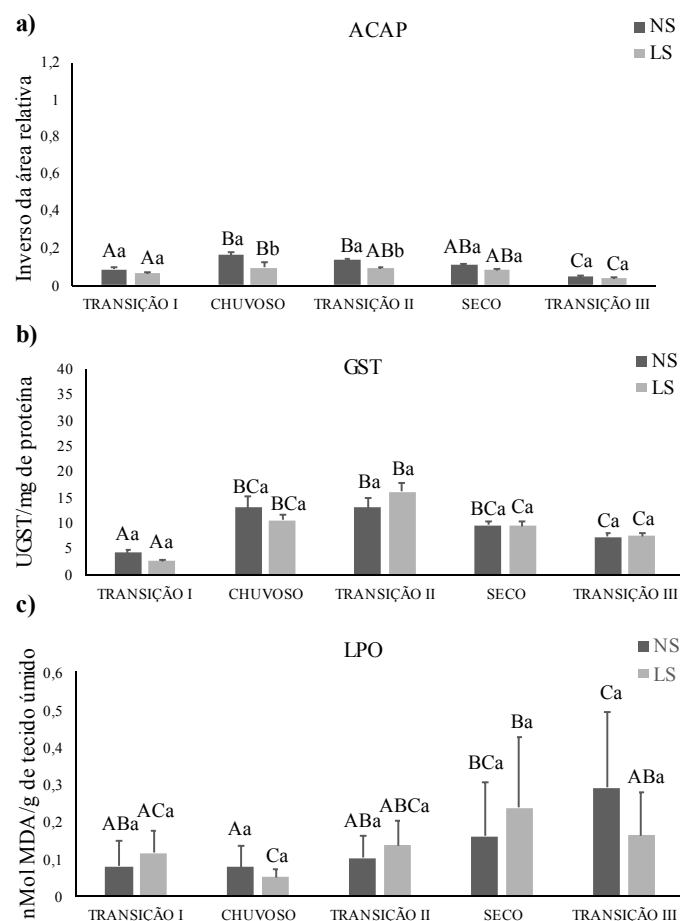


Figura 3: Biomarcadores em brânquias ($n=15$) de *Crassostrea gasar* de duas Resex. Nazaré do Seco (NS) e Lauro Sodré (LS) em cinco períodos sazonais. (a) Capacidade antioxidante total, (b) Glutathione-S-transferase ambas expressas em média \pm erro padrão e (c) lipoperoxidação expresso em mediana \pm quartil. As letras minúsculas diferentes representam diferença ($p < 0,05$) entre os pontos por período e letras maiúsculas diferentes representam diferença ($p < 0,05$) entre os períodos para um mesmo local.

3.4.2 Gônada

A ACAP nas gônadas das ostras oriundas das duas regiões diferenciou-se no período de transição I (NS: $0,16 \pm 0,01$; LS: $0,100 \pm 0,01$) e no período de transição II (NS: $0,09 \pm 0,02$; LS: $0,05 \pm 0,01$), onde as ostras provenientes de LS obtiveram menores valores de competência antioxidante em relação a NS (Fig. 4 a). Observou-se um padrão de aumento da ACAP nas gônadas das ostras das duas áreas durante o período chuvoso (NS: $0,71 \pm 0,04$; LS: $0,56 \pm 0,05$) em relação a competência antioxidante das gônadas dos demais períodos sazonais. Um padrão de queda da ACAP também foi observado em ambas as regiões de cultivo no período de transição I e seco ($p > 0,05$) em relação ao período chuvoso. Organismos do período de transição III de ambas as regiões (NS: $0,04 \pm 0,003$; LS: $0,05 \pm 0,006$) apresentaram diminuição da ACAP, assim como ocorreu queda da ACAP na gônada dos organismos do período de transição II para LS (Fig. 4 a).

Porém, a ACAP nas gônadas dos organismos de ambas as áreas apresentou semelhanças durante o período de transição I e seco ($p > 0,05$) (Fig. 4 a), com um padrão de queda na ACAP nesses períodos em relação ao chuvoso. A mesma semelhança da capacidade antioxidante foi encontrada nas gônadas dos organismos do período de transição II e seco. A capacidade antioxidante total nas gônadas das ostras da NS do período de transição III ($0,04 \pm 0,003$, $p < 0,05$) foi menor em comparação aos organismos dos demais períodos sazonais. Em LS os animais provenientes do período de transição II e III apresentaram diminuição capacidade antioxidante gonadal, quando comparado aos demais períodos (Fig. 4 a).

A atividade da GST nas gônadas dos organismos de ambas as áreas foi semelhante em todos os períodos sazonais (Fig. 4 b). Em NS observou-se aumento da GST nos organismos do período de transição II em relação aos demais períodos sazonais (Fig. 4 b). Ostras do período de transição I ($5,25 \pm 0,41$ UGST/mg de proteína) não apresentou diferença entre os organismos obtidos no período chuvoso ($7,55 \pm 0,60$ UGST/mg de proteína) e transição III ($5,43 \pm 0,93$ UGST/mg de proteína) do mesmo modo em que, se observou semelhança na atividade da enzima nas gônadas das ostras do período chuvoso com as do período seco ($p > 0,005$).

Em LS a GST nas gônadas dos organismos obtidos no período de transição I ($4,31 \pm 0,49$ UGST/mg de proteína) foram semelhantes com as ostras do período de transição III ($7,01 \pm 0,58$ UGST/mg de proteína) (Fig. 4 b). Da mesma forma em que, não se observou variação da atividade da enzima nas ostras do período chuvoso ($9,31 \pm 1,06$ UGST/mg de proteína) com os organismos do período seco ($15,09 \pm 1,73$ UGST/mg de proteína) e de transição III ($7,01 \pm 0,58$

UGST/mg de proteína) (Fig. 4 b). Organismos do período seco apresentaram maior atividade da GST em relação as ostras do período de transição I, II e III, não apresentando com os indivíduos do período chuvoso) (Fig. 4 b).

A lipoperoxidação nas gônadas não apresentou diferenças significativas entre as áreas de coleta para nenhum dos períodos sazonais (Fig. 4c). Organismos de NS obtidos no período de transição III ($0,32 \pm 0,27$ nMol MDA/g de tecido úmido), apresentaram maior conteúdo de lipídeos peroxidados nas gônadas em comparação com as ostras do período de transição I ($0,11 \pm 0,11$ nMol MDA/g de tecido úmido) e transição II ($0,13 \pm 0,09$ nMol MDA/g de tecido úmido) (Fig. 4 c) no entanto, os mesmos apresentaram semelhança no conteúdo de LPO com os organismos do período chuvoso ($0,19 \pm 0,11$ nMol MDA/g de tecido úmido) e seco ($0,25 \pm 0,21$ nMol MDA/g de tecido úmido) Fig. 4 c). Ainda na região de Nazaré do Seco, organismos do período seco também apresentaram semelhança no LPO com os indivíduos do período chuvoso e transição II ($p > 0,005$). Em LS as ostras obtidas no período de transição I ($0,08 \pm 0,04$ nMol MDA/g de tecido úmido) apresentaram menor conteúdo de lipídeos peroxidados em comparação aos do período seco ($0,35 \pm 0,31$ nMol MDA/g de tecido úmido) e transição III ($0,08 \pm 0,04$ nMol MDA/g de tecido úmido). Já as ostras do período de transição II apresentaram semelhança no LPO com os organismos do período seco e transição III ($p > 0,05$).

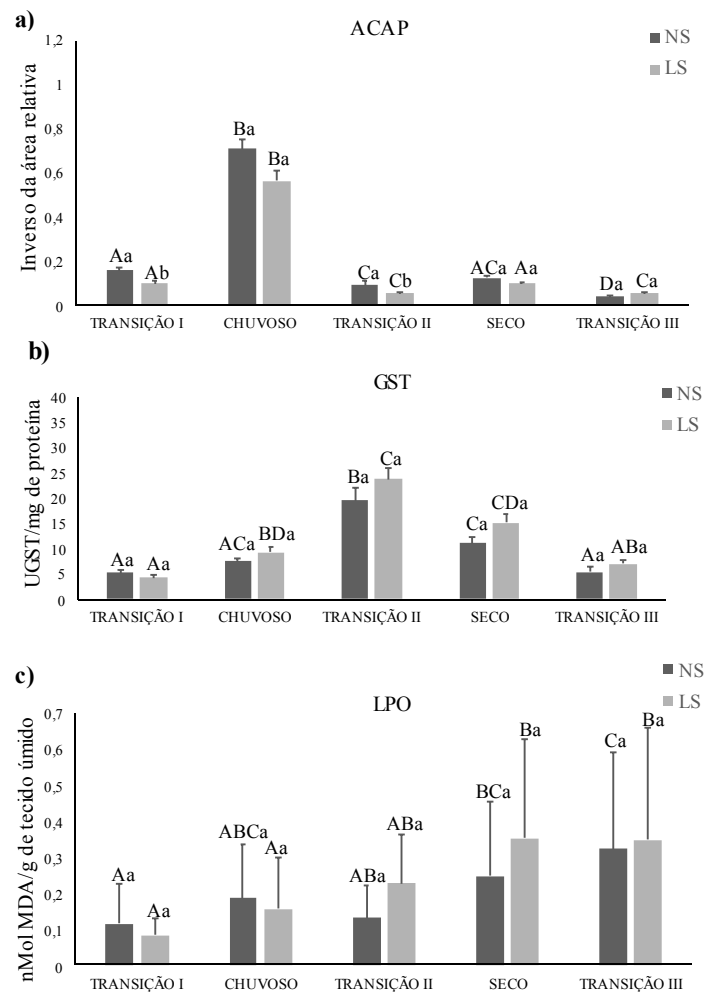


Figura 4: Biomarcadores em gônada (n=15) de *Crassostrea gasar* de duas Resex. Nazaré do Seco (NS) e Lauro Sodré (LS) em cinco períodos sazonais. (a) Capacidade antioxidante total, (b) Glutathiona-S-transferase ambas expressas em média±erro padrão e (c) lipoperoxidação expresso em mediana±quartil. As letras minúsculas diferentes representam diferença ($p < 0,05$) entre os pontos por período e letras maiúsculas diferentes representam diferença ($p < 0,05$) entre os períodos para um mesmo local.

3.4.3 Glândula digestiva

A capacidade antioxidante (ACAP) nas glândulas digestivas dos organismos das duas áreas não apresentou diferença nos valores de competência antioxidante para nenhum dos períodos sazonais estudados (Fig. 5a). Ostras obtidas na região de Nazaré do Seco (NS) durante o período de transição I ($0,08 \pm 0,07$) apresentaram menores valores de competência antioxidante em comparação aos organismos dos demais períodos sazonais (Chuvoso: $0,37 \pm 0,31$; transição II: $0,92 \pm 0,66$; seco: $0,57 \pm 0,41$ e transição III: $0,55 \pm 0,33$) sendo que esses períodos sazonais com semelhança nos valores da ACAP (Fig. 5 a). Organismos da região de Lauro Sodré (LS) obtidos durante o período de transição I ($0,06 \pm 0,05$) apresentaram semelhança na ACAP com os indivíduos do período chuvoso ($0,23 \pm 0,16$) no entanto, os mesmos apresentaram menores valores da ACAP em comparação aos demais períodos estudados. O valor de ACAP também

foi semelhante entre os organismos do período chuvoso com os demais períodos sazonais (transição II: $0,44 \pm 0,08$; seco: $0,44 \pm 0,33$ e transição III: $0,21 \pm 0,10$) (Fig. 5 a).

A atividade da glutathione-S-transferase (GST) nas glândulas digestivas das ostras das duas áreas apresentaram diferença na GST no período de transição I (NS: $5,81 \pm 0,67$; LS: $3,30 \pm 0,27$ UGST/mg de proteína) onde os organismos da NS apresentaram maior atividade da enzima em comparação a LS (Fig. 5 b). Ostras de NS obtidas no período de transição I apresentaram semelhança na GST com os organismos do período de transição III, no entanto os mesmos apresentaram baixa atividade da enzima em comparação aos demais períodos sazonais. Organismos do período chuvoso ($9,53 \pm 0,71$ UGST/mg de proteína) de NS também diferiram dos indivíduos do período de transição II ($14,83 \pm 0,80$ UGST/mg de proteína) e seco ($15,38 \pm 0,67$ UGST/mg de proteína) obtendo menores valores da enzima (Fig. 5 b), já as ostras do período de transição II e seco apresentaram semelhança na atividade da glutathione-S-transferase.

Em LS organismos do período de transição I apresentaram diminuição da GST em comparação aos demais períodos ($p > 0,005$). A glândula digestiva das ostras obtidas no período chuvoso ($13,42 \pm 1,02$ UGST/mg de proteína) apresentaram semelhança na atividade da enzima GST com os organismos do período seco ($14,27 \pm 0,77$ UGST/mg de proteína), já os indivíduos do período de transição II apresentaram aumento da atividade da glutathione-S-transferase em relação aos demais períodos analisados ($p < 0,005$). Continuando na região de Lauro Sodré observou-se que a atividade da GST das ostras do período de transição III diminuíram em relação aos do período chuvoso, transição e seco e aumentou em relação aos organismos do período de transição I (Fig. 5b).

A lipoperoxidação (LPO) na glândula digestiva não apresentou diferenças significativas entre as áreas de estudos para nenhum dos períodos analisados (Fig. 5 c). Ambas as áreas apresentaram aumento do conteúdo de lipídeos peroxidados no período de transição III (NS: $0,47 \pm 0,86$ e LS: $0,56 \pm 0,53$ nMol MDA/g de tecido úmido) em relação ao período de transição I (NS: $0,26 \pm 0,23$ e LS: $0,22 \pm 0,25$ nMol MDA/g de tecido úmido), chuvoso (NS: $0,28 \pm 0,23$ e LS: $0,33 \pm 0,25$ nMol MDA/g de tecido úmido) e transição II (NS: $0,28 \pm 0,21$ e LS: $0,30 \pm 0,25$ nMol MDA/g de tecido úmido), não apresentando diferença com os organismos do período seco (Fig. 5 c). Uma semelhança no conteúdo de lipídeos peroxidados foi encontrada no período de transição I com os organismos do período chuvoso, transição II e seco para ambas as áreas, sendo que em LS os mesmos apresentaram menores valores em comparação ao período seco (Fig. 5 c).

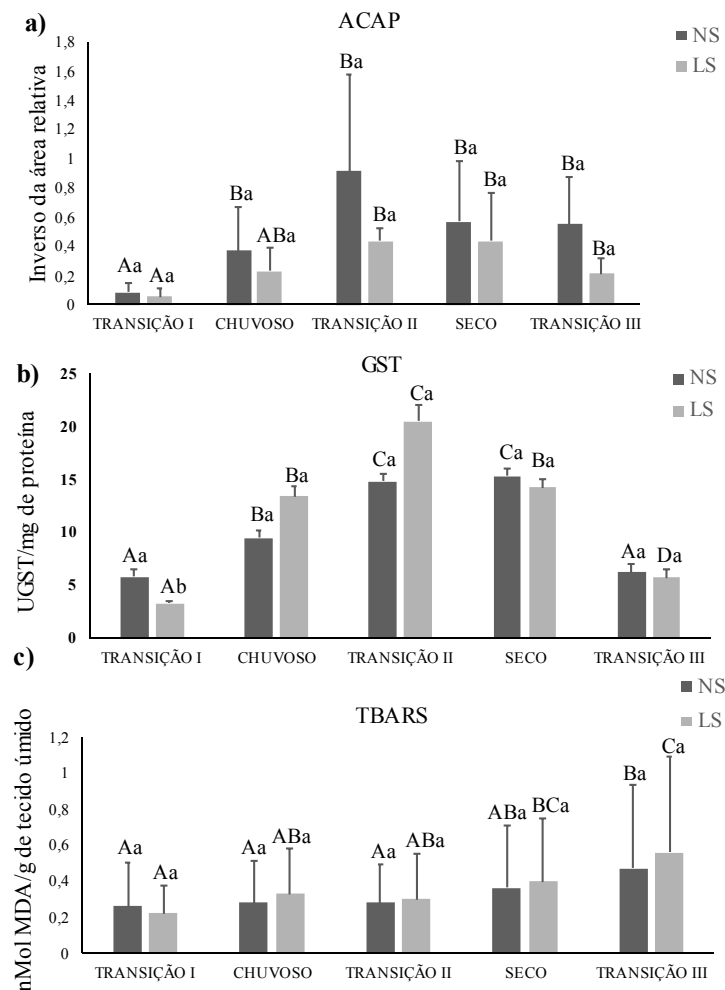


Figura 5: Biomarcadores em glândula digestiva (n=15) de *Crassostrea gasar* de duas Resex. Nazaré do Seco (NS) e Lauro Sodré (LS) em cinco períodos sazonais. (a) Capacidade antioxidante total expressa em mediana±quartil, (b) Glutathione-S-transferase expressa em média±erro padrão e (c) lipoperoxidação expresso em mediana±quartil. As letras minúsculas diferentes representam diferença ($p < 0,05$) entre os pontos por período e letras maiúsculas diferentes representam diferença ($p < 0,05$) entre os períodos para um mesmo local.

3.4.4 Músculo

A capacidade antioxidante total (ACAP) no músculo dos organismos das duas áreas diferenciaram-se no período de transição I (NS: $0,08 \pm 0,03$; LS: $0,04 \pm 0,003$), na qual as ostras da NS apresentaram maiores valores de competência antioxidante em comparação aos organismos da LS (Fig. 6 a). Na região de Nazaré do Seco (NS) os organismos obtidos durante o período de transição apresentaram semelhança na ACAP com os demais períodos sazonais. Em forma similar, os organismos do período chuvoso apresentaram semelhança com os indivíduos do período de transição II e III (Fig. 3 a). Organismos do período seco apresentaram

diferença da ACAP com os indivíduos do período chuvoso obtendo menor competência antioxidante muscular. Já em Lauro Sodré (LS) as ostras do período de transição I apresentaram menor ACAP nos músculos em comparação aos indivíduos do período chuvoso, transição II e seco ($p < 0,05$), não diferindo dos organismos do período de transição III (Fig. 6 a). Já os músculos dos organismos obtidos no período chuvoso foram semelhantes na competência antioxidante com as ostras do período de transição II e seco.

A atividade da glutathione-S-transferase (GST) nos músculos das ostras foi semelhante entre os organismos da NS e LS em todos os períodos sazonais (Fig. 6 b). Organismos de NS do período de transição I ($5,06 \pm 0,47$ UGST/mg de proteína) apresentaram diminuição da GST em relação aos músculos das ostras do período chuvoso ($7,34 \pm 0,35$ UGST/mg de proteína), transição II ($22,27 \pm 2,15$ UGST/mg de proteína) e seco ($8,09 \pm 0,51$ UGST/mg de proteína), no entanto os mesmos apresentaram semelhança da GST com os indivíduos do período de transição III (Fig. 6b). Ostras do período chuvoso apresentaram semelhança da enzima com os organismos do período seco e transição III ($p > 0,05$). Ostras obtidas no período de transição II apresentaram aumento da atividade da enzima em relação aos demais períodos sazonais. Em LS ostras obtidas no período de transição I ($4,74 \pm 0,42$ UGST/mg de proteína) apresentaram semelhança na atividade da enzima com os organismos coletados no período chuvoso ($6,48 \pm 0,31$ UGST/mg de proteína) e transição III ($4,78 \pm 0,43$ UGST/mg de proteína), todavia os mesmos apresentaram menor atividade da GST em comparação aos indivíduos do período de transição II ($25,04 \pm 0,186$ UGST/mg de proteína) e seco ($8,45 \pm 0,63$ UGST/mg de proteína). A mesma semelhança da atividade da enzima GST nos músculos foram encontradas entre os organismos do período chuvoso e seco. Músculo das ostras obtidas no período de transição II ($p < 0,05$) apresentaram aumento da enzima em comparação aos demais períodos sazonais estudados (Fig. 6 b).

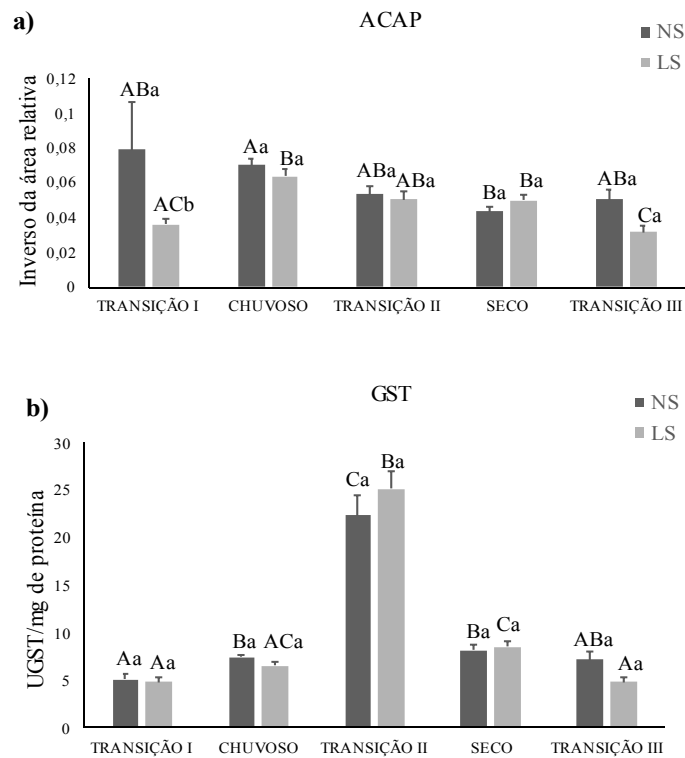


Figura 6: Biomarcadores no músculo (n=15) de *Crassostrea gasar* de duas Resex. Nazaré do Seco (NS) e Lauro Sodré (LS) em cinco períodos sazonais. (a) Capacidade antioxidante total, (b) Glutathione-S-transferase ambas expressas em média±erro padrão. As letras minúsculas diferentes representam diferença ($p < 0,05$) entre os pontos por período e letras maiúsculas diferentes representam diferença ($p < 0,05$) entre os períodos para um mesmo local.

4. Discussão

4.1 Parâmetros físico-químicos da água

O clima da região amazônica é influenciado sobretudo pela descarga fluvial, pela decorrência da precipitação, do vento, da maré e das correntes de maré (Elliott e McLusky 2002). De acordo com os dados pluviométricos, verificamos a intensa influência tanto espacial como temporal do período chuvoso sobre os parâmetros físico-químicos analisados. Essas marcadas variações sazonais relacionadas aos índices de pluviosidade fazem com que as estações possam ser categorizadas em transição seco-chuvoso, chuvoso, transição-chuvoso-seco e seco, justificando a nomenclatura adotada na maioria dos estudos sazonais na região (Paixão et al., 2013). É sabido que a flutuação de variáveis ambientais como temperatura e salinidade pode gerar diferentes níveis de estresse em organismos residentes (Gonçalves et al. 2017). Contudo, os parâmetros da água estudados apresentaram elevada estabilidade térmica temporal, típico das águas estuarinas tropicais, na qual depende de período, do grau de insolação

e das variações meteorológicas (Monteiro et al. 2015). Isso explica a homogeneidade da temperatura encontrada, que variou de 26° a 27, 2 °C.

Os maiores valores de pH encontrados no período de transição I podem estar relacionados a entrada de águas oceânicas, que possuem pH alcalino em torno de 8,1 (De Oliveira et al. 2011), estando também dentro do estabelecido para águas de cultivo (Resolução CONAMA nº 357/2005). Sendo assim, os valores de pH encontrados em ambas as regiões demonstram estar em uma faixa de pH alcalino resultante da contribuição marinha. Os resultados indicaram uma diminuição dos valores de pH do período de transição I para o período chuvoso e do período seco para transição III. Essas mudanças sazonais do pH são resultantes da redução do efeito acidificante do gás carbônico livre e dissolvido, que em grande parte da existência de ácidos orgânicos são transportados para o estuário principalmente nos períodos mais chuvosos explicando, assim o baixo valor de pH durante esses períodos (Carvalho et al. 2000).

Os valores de salinidade encontrados refletem, sazonalmente, a influência das águas continentais, menos salinas, durante o período chuvoso e de transição seco-chuvoso, períodos de maiores valores de precipitação. Estudos demonstram que valores elevados de precipitação resultam no aumento da descarga fluvial de água doce, o que causará diminuição da salinidade dos estuários, além do aumento de matéria orgânica particulada (Dittmar e Lara, 2001) e da produtividade do meio, refletindo em maior disponibilidade de nutrientes (Da Costa et al. 2011; Ramos et al. 2013). Durante o período de transição II, o valor diferenciado de baixíssima concentração de sais encontrado na LS, pode ser explicado pela distância da área com o oceano, além disso a região é fortemente influenciada pela água doce drenada pelos rios próximos a região (Pantoja et al., 2020), sendo também uma região caracterizada por intensas chuvas (Lameira Silva et al., 2020b). Ambas as áreas apresentaram maiores valores de salinidade no período seco, podendo ser explicado pela baixa pluviosidade do período, além do aumento de concentrações de sais dissolvidos na água por meio de correntes de maré (Krumme et al. 2012). Em outros estuários paraenses, com a frequente entrada das águas costeiras, a salinidade atinge índices mais elevados (21 a 36) no final do período menos chuvoso como encontrado no trabalho de dos Santos et al. (2019).

4.2 Biometria

A maioria das variáveis ambientais nas áreas estudadas apresentou-se de forma homogênea, exceto a salinidade que é o fator que, comprovadamente, apresenta considerável impacto no desenvolvimento das ostras (Legat et al. 2017; Pantoja et al. 2020). O maior valor do comprimento e peso total, encontrado nos organismos de Nazaré do Seco durante o período de transição I e II em comparação a Lauro Sodré, demonstra que as ostras daquela região possuem uma maior estabilidade energética e metabólica frente a variação da salinidade, pois nestes períodos a salinidade variou de 8 a 10. Estudo demonstra que a ostra nativa *Crassostrea gasar* tolera bem condições de salinidade compreendidas entre 8 e 34, porém desenvolvem-se melhor em salinidades entre 15 e 25 (Funio et al. 2015).

Em NS os maiores valores de altura e peso foram encontrados no período chuvoso, em comparação aos demais períodos. No período chuvoso a salinidade foi 0 para ambas as regiões. Sabe-se que período de maior chuva, ocorre a diluição das águas, consequentemente maior disponibilidade de alimento, além disso ocorre o acúmulo de energia para serem investidos na reprodução (Pantoja et al. 2020). Resultado oposto foi encontrado entre as regiões no período de transição II, onde LS apresentaram queda nos valores de largura, altura e peso, em comparação a NS e os demais períodos sazonais. Isso representa uma resposta dos organismos à estresse prolongado causado pelas baixas salinidades. As ostras quando são expostas a salinidades próximas ao seu limite de tolerância ocorre alteração na alocação de energia e substratos que estariam disponíveis para o crescimento, devido ao aumento do custo metabólico para sobrevivência (Funio et al. 2015). Nestas condições também pode haver redução da taxa de ingestão e até mesmo suspender a alimentação, o que acarreta na diminuição do crescimento e até mortalidade (Solan, 2016; Bertrand et al. 2017). É sabido que as ostras são osmoconformadoras e que em baixas salinidades, elas tendem a fechar as válvulas para reter água salgada como forma de combate ao estresse osmótico (Sokolov e Sokolova 2019), o que culmina na redução de investimento de energia para crescimento, de modo a reservar demandas energéticas para sobrevivência e reprodução (Lenz e Boehs 2011), com isso ocorre um efeito negativo no crescimento das ostras o que coincide com os nossos resultados, com a salinidade encontrada no período de transição II em LS. Além do mais, se a variação de salinidade durante as chuvas ocorrer em curtos períodos de exposição, as ostras podem sobreviver, pois continuam a se alimentar, mas em um ritmo mais lento (Lavaud et al. 2017).

Em ambas as regiões de estudos ocorrem o cultivo de ostras, no entanto, a região de Lauro Sodré é responsável pelo fornecimento da maior parte das sementes cultivadas nos demais pontos de cultivo da região como Nazaré do Seco (de Souza Sampaio et al. 2019). Dados

não publicados da dissertação de Hoshino, (2009), revelaram que o índice de perda de sementes era elevado como ocorreram nos anos 2007 e 2008, em 2008 grande parte das ostras em fase de engorda foram perdidas durante o período mais chuvoso do ano, períodos onde a salinidade chega a zero ocorre morte das ostras. A área de cultivo de Nazaré do Seco está aproximadamente a 15 km de distância do oceano, recebendo maior aporte de água salgada, já o cultivo das ostras da região de Lauro Sodré em relação ao mar é de aproximadamente 25 km de distância da costa, além do mais essa região é fortemente influenciada pela água doce drenada pelos rios próximos a região (Pantoja et al. 2020). Essas características ambientais demonstram ter grande influência no desenvolvimento das ostras produzidas, sendo as da região de maior proximidade do oceano (NS) maiores e mais pesadas.

Em estudo desenvolvido por Oliveira et al. (2018) sobre a influência da sazonalidade no desempenho de crescimento de *C. gasar* na região amazônica em três regiões de cultivo, sendo umas das suas áreas de estudo a região de Lauro Sodré, os mesmos verificaram que organismos de áreas com baixa salinidade apresentaram crescimento e ganho de peso limitados e também concluíram que o desempenho de crescimento está altamente relacionado à proximidade da fazenda de ostras para o oceano. Já no estudo desenvolvido por (Guzmán-Agüero et al. 2013) sobre o efeitos de diferentes salinidades (20, 30, 40 e 50 ppt) no crescimento e desempenho e consumo de oxigênio de *Crassostrea corteziensis* após 2 semanas, concluíram que a taxa de crescimento e o consumo de oxigênio das ostras diminuíram com o aumento de salinidade. Diante disso, percebe-se que os bivalves marinhos geralmente exibem taxa de crescimento reduzido devido às mudanças de salinidade (Pourmozaffar et al. 2020).

4.3 Biomarcadores

4.3.1 Brânquias

As brânquias são as primeiras barreiras de defesa dos organismos, estando em contato direto com a água, sendo responsável pela troca gasosa, filtração, alimentação e captação de materiais (Belli et al. 2009). Entender a função de cada órgão nos ajuda a interpretar as repostas dos biomarcadores bioquímicos frente a variação dos fatores físico-químicos principalmente a salinidade. Estudos indicam que o estresse induzido pela salinidade geralmente afeta as brânquias, o que leva a produção de espécies reativas de oxigênio (Freitas et al. 2020) levando à oxidação das membranas lipídicas (Carregosa et al. 2014). Observou-se diminuição da ACAP e da GST nos períodos de transição I e III para ambas as áreas de cultivo. Isso sugere maior

demanda do sistema de defesa antioxidante provavelmente frente a um aumento na produção de ERO relacionada ao incremento na produção de a fim da manutenção da homeostase (dos Santos et al. 2021). Ambos os períodos de transição I e III iniciam o aumento da incidência pluviométrica e hidrodinâmica na qual ocorre oscilações dos parâmetros físico-químicos.

A diminuição da GST indica a resposta dos organismos frente ao estresse oxidativo causado pela mudança de salinidade (Freitas et al. 2015). Neste mesmo período observou-se aumento do LPO principalmente para os organismos da NS demonstrando que a diminuição das defesas antioxidantes levou ao aparecimento de dano oxidativo. Além disso, a demanda metabólica aumenta nos períodos de reprodução (seco e seco-chuvoso). Por outro lado, o aumento de lipídios peroxidados e manutenção metabólica expõe o órgão à formação de radicais livres, induzindo um possível dano oxidativo (Gonçalves et al. 2017).

Organismos de ambas as áreas apresentaram uma tendência de aumento da GST no período de transição II em comparação ao período de transição I e III. Esse resultado é mais expressivo no período de transição II, o que pode ser reflexo do efeito da continua descarga fluvial nesse período principalmente em LS. É possível observar, em conjunto com essa resposta enzimática, que o peso total dos animais da LS diminui. A intensa chuva da região torna as águas superficiais menos salinas, o que reflete os baixos valores de salinidade encontrado em LS, além disso período de chuva tornam as águas mais ricas em nutrientes (Da Costa et al. 2011; Ramos et al. 2013). Neste período há maior disponibilidade de alimentos para os organismos advindo da decomposição da matéria orgânica, isso implica no aumento do metabolismo acompanhado do gasto energético e conseqüentemente produção de espécies reativas de oxigênio que resultam na ativação das enzimas antioxidantes e de detoxificação como a GST (Freitas et al. 2020). Estudos ainda indicam que a salinidade é um fator importante que afeta a taxa de filtração em bivalves (Maoxiao et al. 2019). Para sua sobrevivência em condições de baixa salinidade, os bivalves consomem mais energia para prevenir suas mudanças fisiológicas que ocasiona na diminuição da energia disponível para crescimento (Maar et al. 2015).

4.3.2 Gônada

A gônada é o órgão responsável pela maturação dos gametas, e que durante o processo de desenvolvimento dos gametas, requer muita energia e de muitos nutrientes para seu complemento (Nahrgang et al. 2013; Balbi et al. 2017). Em bivalves, existe uma pequena

relação funcional entre o sistema digestivo e o desenvolvimento das gônadas. Logo, os períodos de abundância alimentar e desenvolvimento das gônadas sempre coincidem (Popović et al. 2021). Na costa da Amazônia, as variações sazonais controlam os níveis de salinidade e a disponibilidade de alimentos, o que controla o desenvolvimento das gônadas e a desova de *C.gasar*. (Dittmar e Lara 2001; Lenz e Boehs 2011). A maturação dos gametas ocorre durante o período chuvoso e chuvoso-seco (baixas salinidades e alta precipitação) e desova no período seco e seco-chuvoso (salinidade alta e baixa precipitação) (Paixão et al. 2013). Isso explica os nossos achados, onde observou-se alta ACAP no período chuvoso e alta atividade da GST no período de transição II para NS e também no período seco para LS. Estudos ainda indicam que as alterações fisiológicas induzidas pelo ciclo reprodutivo aumentam a produção de ERO, o que também promoveria o aumento da atividade das enzimas como a da GST (Uluturhan et al. 2019).

Evidências prévias mostram que o crescimento somático dos organismos diminui durante o processo de reprodução quando a energia está dirigida a formação do tecido reprodutivo, sendo a gametogênese considerada um fator endógeno que afeta o desenvolvimento (Weng e Wang 2019). Este fato corrobora com os nossos dados, já que os pesos máximos foram observados nas ostras de LS no período chuvoso, coincidindo com o pico da ACAP, seguidos por uma diminuição no período de transição II, pico da GST. Mecanismos que requerem níveis elevados de energia como a reprodução podem aumentar a fonte de estresse oxidativo, sobrecarregando os bivalves. Deste modo os mesmos não conseguem lidar de forma eficaz, ocorrendo assim a diminuição das defesas antioxidantes, com ou sem aumento da geração de ERO (Storhaug et al. 2019).

Os resultados do LPO nas ostras do presente estudo também acompanham a variação do estado reprodutivo, dado que, o estado hormonal, está entre os fatores endógenos que induz a danos oxidativos (Popović et al. 2020). Por isso, a indução dos picos sazonais de LPO no período seco e no período de transição III podem estar relacionados à desova. Estudos mostram que o ovário em fase reprodutiva contém uma alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados tornando-os suscetíveis a danos oxidativos (Popović et al. 2021). A peroxidação lipídica induzida por variação sazonal foi relatada em diversos modelos biológicos, incluindo o trabalho de (Schmidt et al. 2012) na costa alta em comparação com a costa baixa, (Popović et al. 2021) no trabalho sobre propriedades bioquímicas e de defesa antioxidante em diferentes estações.

4.3.3 Glândula digestiva

A glândula digestiva consiste em muitos túbulos com terminações cegas que são revestidos por um epitélio digestivo constituído de células digestivas e basofílicas (Aarab et al. 2011). Ela está envolvida na maior parte da biotransformação de processos e ciclos redox (Koehlé-Divo et al. 2019). No nosso trabalho observamos diferenças na competência antioxidante na glândula digestiva. Atividades antioxidantes mais elevadas foram geralmente observadas na glândula digestiva em relação aos outros órgãos analisados, como Shenai-Tirodkar et al., (2017) reporta no seu trabalho. De acordo com Blasco e colaboradores (2016), a GST está principalmente localizada na fração citosólica da glândula digestiva, o que explica os maiores valores identificados neste órgão.

Observou-se aumento da GST no período de transição II para ambas as áreas e também no período seco para os organismos de Nazaré do Seco. Esse resultado pode estar relacionando ao aumento da atividade metabólica relacionada às elevações sazonais da temperatura, e da salinidade, bem como a intensa atividade reprodutiva que ocorre em ambos os períodos, sendo a glândula digestiva um dos órgãos responsáveis pelo armazenamento de nutrientes e energia para o processo da gametogênese (Popović et al. 2020). Sari e colaboradores (2020) nos seus estudos com a espécie *Anomalocardia flexuosa* também observaram valores elevados da enzima GST na glândula digestiva associando também os seus resultados com o aumento da taxa metabólica dos organismos.

Observou-se também, que o pico da GST encontrado nesses períodos coincidem com os resultados observados na gônada como relatado anteriormente. Nesse período de transição II ocorre a maturação e no período seco ocorre a desova dos gametas (Paixão et al. 2013), demonstrando que a enzima antioxidante da glândula digestiva é afetada por fatores internos como nutrição e a desova (Borković-Mitić et al. 2013) e que a variação da atividade da GST depende do estado fisiológico dos organismos. Por outro lado, observou-se diminuição da ACAP nos organismos do período de transição I e da enzima GST nos organismos do período de transição I e III com um aumento do conteúdo de lipídeos peroxidados no período de transição III em comparação aos do período de transição I, II, chuvoso e seco, para ambas as áreas. É sabido que além da longa maturação a disponibilidade de alimentos influencia na bioquímica dos bivalves (Schmidt et al. 2013) isso explica o alto valor encontrado na peroxidação lipídica encontrada no período de menos chuva como no período de transição III.

4.3.4 Músculo

O isolamento dos organismos frente a variação do meio foi descrito como uma resposta contra o estresse salino (Borković-Mitić et al. 2013). Para escapar das condições estressantes os bivalves fecham suas válvulas sendo os músculos adutores responsáveis por esta função (Claros et al., 2021). Observou-se indução da atividade da GST durante o período de transição II, do mesmo modo que foi observado na gônada e na glândula digestiva. Além da função de abrir e fechar as conchas, os músculos auxiliam na quebra de glicogênio para fornecer energia para o desenvolvimento das gônadas (Popović et al. 2020). Como dito no item 4.3.3, no período de transição II ocorre a maturação dos gametas, presumindo que esse aumento da GST tenha ocorrido pelo aumento de produção de energia e conseqüentemente aumento da produção de espécie reativa de oxigênio. Além do mais, neste período ocorreu baixa salinidade, especificamente nos animais da região de LS, que culminou com baixos valores do peso total apresentados pelos organismos. Os bivalves reduzem a quantidade de tempo que abrem suas válvulas para reduzir sua exposição ao estressor, que deve afetar o seu metabolismo e o potencial de crescimento devido ao seu alto custo energético, além disso os organismos passaram por um metabolismo anaeróbico que diminuirá a produção de energia que certamente afetará no crescimento dos organismos (Bal et al. 2021).

Um aumento da competência antioxidante (ACAP) foi encontrado durante o período chuvoso (baixa salinidade) em relação ao período seco (alta salinidade) nas ostras da NS. Presume-se que a demanda de regulação osmótica ocasionada pela diminuição da salinidade tenha gerado aumento da necessidade de exercício nos organismos através do fechamento das conchas como forma de proteção contra o estresse osmótico (causado pela diminuição ou pelo aumento da salinidade, fora dos limites de tolerância da espécie) (McFarland et al. 2013) sendo tal comportamento chamado de pseudo-osmorregulação facultativa (Berger e Kharazova 1997). Além disso, a energia que estaria disponível para o consumo diminuiu em consequência do efeito da baixa salinidade, ocasionando gasto energético, o que resulta na diminuição da energia disponível para respostas fisiológicas, como o crescimento (Pourmozaffar et al. 2020), o que explica assim, os nossos achados no valor do peso total que foi menor no período chuvoso.

Pelo fato dos músculos serem os órgãos menos responsivos nas análises dos biomarcadores, não foi possível detectar a peroxidação lipídica pelo método TBARS, foram feitos testes usando 30, 60, 80 e 100 µl de amostra, no entanto os resultados mantiveram negativos, por isso, foi possível determinar se ocorreu ou não dano oxidativo nesse órgão.

5. Conclusão

O presente estudo avaliou os níveis basais do sistema de defesa antioxidante em ostras-do-mangue *C. gasar* em sistemas de cultivo, ao longo de um ano, em quatro diferentes tecidos e a partir disso concluímos que:

- As variações físico-químicas da água, principalmente a salinidade, junto a sazonalidade da região são fatores que afetam o crescimento e processos bioquímicos das ostras.
- Para equilibrar as condições de extrema variação do meio ou pelo menos condições que estejam longe do ótimo, os bivalves desenvolveram mecanismos de estratégias e adaptativos para compensar suas condições. Todavia, observou-se ocorrência de alterações dos biomarcadores analisados.
- A capacidade antioxidante total (ACAP), a atividade da enzima glutathione-S-transferase (GST) e a peroxidação lipídica (LPO) nos tecidos analisados são influenciados pela sazonalidade independentemente do local.
- Os resultados reforçam a importância do conhecimento da sazonalidade do estado oxidativo dos bivalves em relação ao manejo e cultivo dos bivalves na região amazônica, em particular a ostra-do-mangue *C. gasar*.

Referências

- Aarab, N., Godal, BF., Bechmann, RK., 2011. Seasonal variation of histopathological and histochemical markers of PAH exposure in blue mussel (*Mytilus edulis* L.). Marine Environmental Research. 71, 213-217. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.01.005>
- Amado, LL., Garcia, ML., Ramos, PB., Freitas, RF., Zafalon, B., Ribas, FJL., Yunes, JS., Monserrat, JM., 2009. 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.038>
- Bainy, ACD., Saito, E., Carvalho, PSM., Junqueira, VBC., 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. Aquatic Toxicology. 34, 151-162. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(95\)00036-4](https://doi.org/10.1016/0166-445X(95)00036-4)
- Bal, A., Panda, F., Pati, SG., das Kajari, APK., Paital, B., 2021. Modulation of physiological oxidative stress and antioxidant status by abiotic factors especially salinity in aquatic organisms: Redox regulation under salinity stress. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 241, 108971. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108971>

- Balbi, T., Fabbri, R., Montagna, M., Camisassi, G., Canesi, L., 2017. Seasonal variability of different biomarkers in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) farmed at different sites of the Gulf of La Spezia, Ligurian sea, Italy. *Marine Pollution Bulletin*. 116, 348-356. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.035>
- Baldan, AP., Bendhack, F., 2017. Maricultura sustentável no litoral do Paraná, Brasil: atualidades e perspectivas. *Revista Acadêmica: Ciência Animal*. 7, 491-497. <http://dx.doi.org/10.7213/cienciaanimal.v7i4.10298>
- Belli, NM., Faleiros, RO., Firmin, KCS., Masui, DC., Leone, FA., McNamara, JC., Furriel, RPM., 2009. Na,K-ATPase activity and epithelial interfaces in gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 152, 431-439. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.11.017>
- Berger, VJ., Kharazova, AD., 1997. Mechanisms of salinity adaptations in marine molluscs. *Hydrobiologia*. 355, 115–126. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1907-0_12
- Berrêdo, JF., da Costa, ML., Vilhena, MPSP., dos Santos, JT., 2008. Mineralogia e geoquímica de sedimentos de manguezais da costa amazônica: o exemplo do estuário do rio Marapanim (Pará). *Revista Brasileira de Geociências*. 38,24-35. <https://doi.org/10.25249/0375-7536.20083812435>
- Bertrand, C., Devin, S., Mouneyrac, S., Giambérini, L., 2017. Eco-physiological responses to salinity changes across the freshwater-marine continuum on two euryhaline bivalves: *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana*. *Ecological Indicators*. 74, 334-342. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.11.029>
- Borković-Mitić, S., Pavlović, S., Perendija, BR., Despotović, SG., Gavrić JP., Gačić, Z., Saičić, Z., 2013. Influence of some metal concentrations on the activity of antioxidant enzymes and concentrations of vitamin E and SH-groups in the digestive gland and gills of the freshwater bivalve *Unio tumidus* from the Serbian part of Sava River. *Ecological Indicators*. 32, 212-221. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.03.024>
- Capparelli, MV., Gusso-Choueri, PK., Abessa, DMS., McNamara, CJ., 2019. Seasonal environmental parameters influence biochemical responses of the fiddler crab *Minuca rapax* to contamination in situ. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 216, 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.11.012>
- Carranza, A., Defeo, O., Beck, M., 2009. Diversity, conservation status and threats to native oysters (Ostreidae) around the Atlantic and Caribbean coasts of South America. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. 19, 344-353. <https://doi.org/10.1002/aqc.993>
- Carregosa, V., Velez, C., Soares, AMVM., Figueira, E., Freitas, R., 2014. Physiological and biochemical responses of three *Veneridae* clams exposed to salinity changes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*. 177-178, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.08.001>
- Carvalho, AR., Schlittle, FHM., Tornisiolo, VL., 2000. Influence of cattle ranching and agricultural activities on physical chemical parameters of water. *Química Nova*. 23, 618-622. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000500009>

Chan, CY., Wang, WX., 2018. A lipidomic approach to understand copper resilience in oyster *Crassostrea hongkongensis*. *Aquatic Toxicology*. 204, 160-170.

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.09.011>

De Almeida, EA., Bain, ACD., Loureiro, AP., Martinez, GR., Miyamoto, S., Onuki, J., Barbsa, LJ., Garcia, CCM., Prado, FM., Ronsein, GE., Sigolo, CA., Brochini, CB., Martins, AMG., de Medeiros, MHG., Di Mascio, P., 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 146, 588-600.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.040>

Da Costa, VB., De Sousa, EB., Pinheiro, SCC., Pereira, LCC., Da Costa, RM., 2011. Effects of a high energy coastal environment on the structure and dynamics of phytoplankton communities (Brazilian Amazon littoral). *Journal of Coastal Research*. 64, 354-358.

<https://www.jstor.org/stable/26482192>

De Oliveira, LC., Botero, WG., Dos Santos, A., De Oliveira, MCC., Rocha, JC., Da Silva, HC., 2011. Influence of physical and chemical characteristics of soils in the hydrobiogeochemical cycle of mercury in the rio aracá – AM. *Química Nova*. 34, 1303-1308.

<https://doi.org/10.1590/s0100-40422011000800002>

de Souza, DS., Tagliaro, CH., Schneider, H., Beasley, CR., 2019. Oyster culture on the Amazon mangrove coast: asymmetries and advances in an emerging sector. *Reviews in Aquaculture*. 11, 88-104. <https://doi.org/10.1111/raq.12227>

Dittmar, T., Lara, RJ., 2001. Driving forces behind nutrient and organic matter dynamics in a mangrove tidal creek in North Brazil. 52, 249-259. <https://doi.org/10.1006/ecss.2000.0743>

dos Santos, CCM., da Costa, JFM., dos Santos, CRM., Amado, LL., 2019. Influence of seasonality on the natural modulation of oxidative stress biomarkers in mangrove crab *Ucides cordatus* (Brachyura, Ucididae). *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*. 227, 146-153.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.10.001>

dos Santos, CCM., Ferreira, JA., dos Santos, CRM., Amado, LL., 2021. Seasonal modulation of oxidative stress biomarkers in mangrove oyster (*Crassostrea gasar*) from an Amazon estuary. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*. 257, 110953. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.110953>

Elliott, M., McLusky, DS., 2002. The need for definitions in understanding estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 55, 815-827. <https://doi.org/10.1006/ecss.2002.1031>

Faggio, C., Tsarpali, V., Dailianis, S., 2018. Mussel digestive gland as a model tissue for assessing xenobiotics: An overview. *Science of the Total Environment*. 636, 220-229.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.264>

FAO, 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture. Contributing to food security and nutrition for all. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 17, 1391-1401.

- Ferreira, CP., Lima, D., Souza, P., Piazza, TB., Zacch, FL., Mattos, JJ., Jorge, MB., Almeida, EA., Bianchini, A., Taniguchi, S., Sasaki, ST., Montone, RC., Bicego, MC., Bainy, ACD., Lüchmann, KH., 2020. Short-term spatiotemporal biomarker changes in oysters transplanted to an anthropized estuary in Southern Brazil. *Science of the Total Environment*. 709, 136042. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136042>
- Foster, C., Amado, EM., Souza, MM., Freire, CA., 2010. Do osmoregulators have lower capacity of muscle water regulation than osmoconformers? A study on decapod crustaceans. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*. 313, 80-98. <https://doi.org/10.1002/jez.575>
- Freitas, R., Pires, A., Velez, C., Almeida, A., Wrona, FJ., Soares, AMVM., Figueira, E., 2015. The effects of salinity changes on the Polychaete *Diopatra neapolitana*: Impacts on regenerative capacity and biochemical markers. *Aquatic Toxicology*. 163, 167-176. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.04.006>
- Freitas, R., Pires, S., Coppola, F., Meucci, V., Battaglia, F., Intorre, L., Soares, AMVM., Pretti, C., Faggio, C., 2020. Combined effects of salinity changes and salicylic acid exposure in *Mytilus galloprovincialis*. *Science of the Total Environment*. 715, 136804. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136804>
- Funo, ICSA., Antonio, ÍG., Marinho, YF., Gálvez, AO., 2015. Influence of salinity on survival and growth of *Crassostrea gasar*. *Boletim do Instituto de Pesca*. 41, 837-847. <https://doi.org/10.32360/acmar.v41i1.6084>
- Gomes, CHAM., Silva, FC., Lopes, GR., Melo, CMR., 2014. Ciclo reprodutivo da ostra *Crassostrea gasar*. *Brazilian Journal of Biology*. 74. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.04912>
- Gonçalves, AMM., Barroso, DV., Serafim, TL., Verdelhos, T., Marques, JC., Gonçalves, F., 2017. The biochemical response of two commercial bivalve species to exposure to strong salinity changes illustrated by selected biomarkers. *Ecological Indicators* .77, 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.01.020>
- Guzmán-Agüero, JE., Nieves-Soto, M., Hurtado, MÁ., Piña-Valdez, P., Garza-Aguirre, MC., 2013. Feeding physiology and scope for growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) acclimated to different conditions of temperature and salinity. *Aquaculture International*. 21, 283-297. <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9550-4>
- Habig, WH., Jakoby, WB., 1981. Assays for Differentiation of Glutathione S-Transferases. *Methods in Enzymology*. 77, 398-405. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77053-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77053-8)
- Horodesky, A., Castilho-Westphal, GG., Coze, r N., Rossi, VG., Ostrensky, A., 2019. Effects of salinity on the survival and histology of oysters *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757). *Bioscience Journal*. 35, 12-18. <https://doi.org/10.14393/BJ-v35n2a2019-42099>
- Koehlé-Divo, V., Pain-Devin, S., Bertrand, C., Devin, S., Mouneyrac, C., Giambérini, L., Sohm, B., 2019. *Corbicula fluminea* gene expression modulated by CeO₂ nanomaterials and salinity. *Environmental Science and Pollution Research*. 26, 15174–15186. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04927-3>
- Krumme, U., Herbeck, LS., Wang, T., 2012. Tide- and rainfall-induced variations of physical and chemical parameters in a mangrove-depleted estuary of East Hainan (South China Sea). *Marine Environmental Research*. 82, 28-39. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.09.002>

- Lameira, OLS., Macedo, ARG., Nunes, ESCL., Campos, KD., Araújo, LCC., Pinto, ASO., Joele, MRSP., Ferreira, MC., da Silva, ACR., Raices, RSL., da Cruz, AG., Juen, L., da Rocha RM., 2020a. Effect of environmental factors on the fatty acid profiles and physicochemical composition of oysters (*Crassostrea gasar*) in Amazon estuarine farming. 51, 2336–2348. <https://doi.org/10.1111/are.14577>
- Lameira, OLS., Veríssimo, SMM., da Rosa, MBP., Iguchi, YB., Nunes, ESCL., de Moraes, CM., Cordeiro, CAM., Xavier, DA., Pinto SO., Joele, MRSP., Brito, JS., Juen, L., da Rocha RM., 2020b. Effect of environmental factors on microbiological quality of oyster farming in Amazon estuaries. *Aquaculture Reports*. 18, 100437. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100437>
- Lavaud, R., LaPeyre, MK., Casas, SM., Bacher, C., La Peyr JF., 2017. Integrating the effects of salinity on the physiology of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, in the northern Gulf of Mexico through a Dynamic Energy Budget model. *Ecological Modelling* 363, 221-233. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2017.09.003>
- Legat, JFA., Puchnick-Legat, A., Gomes, CHAM., Sühnel, S., Melo, CMR., 2017. Effects of salinity on fertilization and larviculture of the mangrove oyster, *Crassostrea gasar* in the laboratory. *Aquaculture*. 468, 545-548. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.016>
- Lenz, T., Boehs, G., 2011. Ciclo reproductivo del ostión de manglar *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) en la Bahía de Camamu, Bahia, Brasil. *Revista de Biología Tropical*. 59, 137-149. <https://doi.org/10.15517/rbt.v59i1.3184>
- Li, A., Li, L., Wang, W., Song, K., Zhang, G., 2018. Transcriptomics and fitness data reveal adaptive plasticity of thermal tolerance in oysters inhabiting different tidal zones. *Frontiers in Physiology*. 9, 825. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00825>
- Lopes, GR., Gomes, CHA de M., Tureck, CR., de Melo, CMR., 2013. Growth of *Crassostrea gasar* cultured in marine and estuary environments in Brazilian waters. *Aquaculture*. 48, 975-982. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000800024>
- Maar, M., Saurel, C., Landes, A., Dolmer, P., Petersen, JK., 2015, Growth potential of blue mussels (*M. edulis*) exposed to different salinities evaluated by a Dynamic Energy Budget model. *Journal of Marine Systems*. 148, <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2015.02.003>
- Magara, G., Khan, FR., Pinti, M., Syberg, K., Inzirillo, A., Elia, AC., 2019. Effects of combined exposures of fluoranthene and polyethylene or polyhydroxybutyrate microplastics on oxidative stress biomarkers in the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*. 82, 616-625. <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1633451>
- Maoxiao, P., Xiaojun, L., Donghong, N., Bo, Y., Tianyi, L., Zhiguo, D., Jiale, L., 2019. Survival, growth and physiology of marine bivalve (*Sinonovacula constricta*) in long-term low-salt culture. *Scientific Reports*. 9, 2819. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39205-2>
- McFarland, K., Donaghy, L., Volety, AK., 2013. Effect of acute salinity changes on hemolymph osmolality and clearance rate of the non-native mussel, *Perna viridis*, and the native oyster, *Crassostrea virginica*, in Southwest Florida. *Aquatic Invasions*. 8, 299-310. <https://doi.org/10.3391/ai.2013.8.3.06>
- Monteiro, S de M., El-Robrini, M., Alves, IC.C, 2015. Seasonal dynamics of nutrients in an Amazon estuary. *Mercator*. 14, 151-162,. <https://doi.org/10.4215/rm2015.1401.0010>

Nahrgang, J., Brooks, S.J., Evenset, A., Camus, L., Jonsson, M., Smith, T.J., Lukina, J., Frantzen, M., Giarratano, E., Renaud, P.E., 2013. Seasonal variation in biomarkers in blue mussel (*Mytilus edulis*), Icelandic scallop (*Chlamys islandica*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*)-Implications for environmental monitoring in the Barents Sea. *Aquatic Toxicology*. 127, 21-35. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.01.009>.

Oakes, K.D., Van Der Kraak, G.J., 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*. 63, 447-463. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00204-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00204-7)

Oliveira, MAS., Baraún, RA., Marcon, DJ., Lago, LAB., Silva, A., Lusio, J., Tavares, RDS., Tacão, M., Henriques, I., Schneide,r MPC., 2020. Occurrence, antibiotic-resistance and virulence of *E. coli* strains isolated from mangrove oysters (*Crassostrea gasar*) farmed in estuaries of Amazonia. *Marine Pollution Bulletin*. 157, 111302. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111302>

Oliveira, LFS., Ferreira, MAP., Juen, L., Nunes, ZMP., Pantoja, JCD., Paixão, LF., de Lima, MNB., da Rocha, RM., 2018. Influence of the proximity to the ocean and seasonality on the growth performance of farmed mangrove oysters (*Crassostrea gasar*) in tropical environments. *Aquaculture*. 495, 661-667. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.049>

Paixão, L., Ferreira, MA., Nunes, Z., Fonseca-Sizo, F., da Rocha, RM., 2013. Effects of salinity and rainfall on the reproductive biology of the mangrove oyster (*Crassostrea gasar*): Implications for the collection of broodstock oysters. *Aquaculture*. 380-383, 6-12. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.11.019>

Pantoja, JCD., Oliveira, FS., Ferreira, MAP., Silva, BRM., Nunes, ZMP., Mendes, YA., de Oliveira, RS., da Rocha, RM., 2020. Salinity and rainfall as inducers of cell proliferation and apoptosis in mangrove oyster *Crassostrea gasar* spermatogenesis. *Regional Studies in Marine Science*. 39, 101411. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101411>

Pereira, OM., Henriques, MB., Machado, IC., 2003. Estimativa da curva de crescimento da ostra *Crassostrea brasiliiana* em bosques de mangue e proposta para sua extração ordenada no estuário de Cananéia, SP, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*. 29, 19-28.

Pereira, OM., Machado, IC., Henriques, MB., Galvão, MSN., Santos, M., Yamanaka, N., 2001. Avaliação do estoque da ostra *Crassostrea brasiliiana* em rios e gamboas da região estuarino-lagunar de Cananéia (São Paulo, Brasil). *Boletim do Instituto de Pesca Sao Paulo*. 27, 85 – 95.

Pinto-Coelho, RM., Havens, K., 2015. Crise nas águas: educação, ciência e governança juntos evitando conflitos gerados pela escassez e pela perda da qualidade das águas. Recóleo Editora, Belo Horizonte, (MG). ISBN 978-85-61502-05-8, 162 pgs.

Popović, NT., Krbavčić, M., Barišić, J., Ljubić, BB., Strunjak-Perović, I., Babić, S., Lorencin, V., Matulić, D., Tomljanović, T., Čož-Rakovac, R., 2021. Comparative Tissue Responses of Marine Mollusks on Seasonal Changes in the Northern Adriatic Sea. *Applied Sciences*. 11, 2874. <https://doi.org/10.3390/app11062874>

Popović, NT., Ljubić, BB., Strunjak-Perović, I., Lorencin, V., Jadan, M., Čižmek, L., Matulić, D., Bojanić, K., Čož-Rakovac, R., 2020. Seasonal antioxidant and biochemical properties of the Northern Adriatic *Pecten jacobaeus*. *PLoS One*. 15, 230539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230539>

- Pourmozaftar, S., Jahromi, ST., Rameshi, H., Sadeghi, A., Bagheri, T., Behzadi, S., Gozari, M., Zahedi, MR., Lazarjani, SA., 2019. The role of salinity in physiological responses of bivalves. *Reviews in Aquaculture*. 12, 1548-1566. <https://doi.org/10.1111/raq.12397>
- Ramos, CO., Ferreira, JF., de Melo, CMR., 2013. Maturation of native oyster *Crassostrea gasar* at different diets in the laboratory. *Boletim do Instituto de Pesca*. 39. 107-120. <https://www.pesca.sp.gov.br/boletim/index.php/bip/article/view/983>
- Rivera-Ingraham, GA., Lignot, JH., 2017. Osmoregulation, bioenergetics and oxidative stress in coastal marine invertebrates: Raising the questions for future research. *Journal of Experimental Biology*. 220, 1749–1760. <https://doi.org/10.1242/jeb.135624>
- Schmidt, W., O’Shea, T., Quinn, B., 2012. The effect of shore location on biomarker expression in wild *Mytilus spp.* and its comparison with long line cultivated mussels. *Marine Environmental Research*. 80, 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.07.002>
- Schmidt, W., Power, E., Quinn, B., 2013. Seasonal variations of biomarker responses in the marine blue mussel (*Mytilus spp.*). *Marine Pollution Bulletin*. 74, 50-55. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.07.033>
- Shenai-Tirodkar, PS., Gauns, UM., Mujawar, MWA., Ansari, ZA., 2017. Antioxidant responses in gills and digestive gland of oyster *Crassostrea madrasensis* (Preston) under lead exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 142, 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.056>
- Sokolov, EP., Sokolova, IM., 2019. Compatible osmolytes modulate mitochondrial function in a marine osmoconformer *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Mitochondrion*. 45, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2018.02.002>
- Solan, MWN., 2016. *Stressors in the Marine Environment – Physiological and ecological responses; societal implications*. Oxford Scholarship Online. ISBN-13: 9780198718826. 10.1093/acprof:oso/9780198718826.001.0001
- Souza-Filho, PWM., Lessa, GC., Cohen, MCL., Costa, FR., Lara, RJ., 2009. The Subsiding Macrotidal Barrier Estuarine System of the Eastern Amazon Coast, Northern Brazil. *Lecture Notes in Earth Sciences*. 107, 347-375. https://doi.org/10.1007/978-3-540-44771-9_11
- Storhaug, E., Nahrgang, J., Pedersen, KB., Brooks, ST., Petes, L., Bakhmet, IN., Frantzen, M., 2019. Seasonal and spatial variations in biomarker baseline levels within Arctic populations of mussels (*Mytilus spp.*) 656, 921-936. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.397>
- Uluturhan, E., Darilmaz, E., Kontas, A., Bilgin, M., Alyuruk, H., Altay, O., Sevgi, S., 2019. Seasonal variations of multi-biomarker responses to metals and pesticides pollution in *M. galloprovincialis* and *T. decussatus* from Homa Lagoon, Eastern Aegean Sea. *Marine Pollution Bulletin*. 141, 176-186. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.02.035>
- Urbina, MA., Glover, CN., 2015. 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. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.07.014>
- Usese, AI., Elike, MI., Moruf, RO., Chukwu, LO., 2019. Levels of oxidative stress markers in the mangrove oyster, *Crassostrea gasar* from a coastal ecosystem in southwest Nigeria. *Journal of Research in Forestry, Wildlife and Environment*. 11, 32 – 38.
- Valenzuela-Castillo, A., Sánchez-Paz, A., Castro-Longoria, R., López-Torres, MA., Grijalva-Chon, JM., 2015. Seasonal changes in gene expression and polymorphism of hsp70 in

cultivated oysters (*Crassostrea gigas*) at extreme temperatures. Marine Environmental Research. 110, 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.07.019>

Varela, ES., Beasley, CR., Schneider, H., Sampaio, I., Marques-Silva, NS., Tagliaro, CH., 2007. Molecular phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. Journal of Molluscan Studies. 73, 229–234. <https://doi.org/10.1093/mollus/eym018>

Weng, N., Wang, WX., 2019. Seasonal fluctuations of metal bioaccumulation and reproductive health of local oyster populations in a large contaminated estuary. Environmental Pollution. 250, 175-185. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.019>

Yang, CY., Sierp, MT., Abbott ,CA., Li, y., Qin, JG., 2016. Responses to thermal and salinity stress in wild and farmed Pacific oysters *Crassostrea gigas*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 201, 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.06.024>

Zar, JH .,1984. Biostatistical analysis 2nd edition. Pren ti ce-Ha ll, En glewood Cliffs, USA

CAPÍTULO 2

Respostas cardíacas em *Crassostrea gasar* sob imersão e emersão: uma investigação experimental de como o ciclo de maré influencia o funcionamento do coração da ostra-do-mangue

PERGUNTA

Como responde a atividade cardíaca de ostras *C. gasar* durante imersão em água salina e emersão (exposição atmosférica), simulando-se o que ocorre em um ciclo de maré?

HIPÓTESE

Ostras sob imersão aquática mantêm sua atividade cardíaca, enquanto que as ostras emersas modulam sua atividade cardíaca, reduzindo-a, como estratégia de sobrevivência.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterizar os registros basais do eletrocardiograma da ostra-do-mangue *Crassostrea gasar* e o funcionamento cardíaco durante a imersão na água salina e emersão com exposição ao ar.

Objetivos específicos

- Caracterizar os registros eletrocardiográficos basais da espécie *Crassostrea gasar*;
- Investigar os efeitos da exposição aérea sobre a atividade cardíaca nas ostras;
- Avaliar o eletrocardiograma (ECG) das ostras de forma qualitativa por meio do traçado cardíaco e de forma quantitativa por meio dos parâmetros cardíacos.

MANUSCRITO CIENTÍFICO

Respostas cardíacas em *Crassostrea gasar* sob imersão e emersão: uma investigação experimental de como o ciclo de maré influencia o funcionamento do coração da ostra-do-mangue

Irina Sofia Cardoso de Carvalho^{abc}, Sildiane Martins Cantanhêde^{bc}, Moisés Hamoy^d, José Ribamar da Cruz Freitas Júnior^e, Lílian Lund Amado^{abc*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, Núcleo de Ecologia Aquática e Pesca, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, Brasil.

^bLaboratório de Ecotoxicologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, Brasil.

^cLaboratório de Pesquisa em Monitoramento Ambiental Marinho, Instituto de Geociências, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, Brasil.

Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém – PA, Brasil

^eLaboratório de Aquicultura, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Castanhal-PA, Brasil.

*Autor para correspondência: Lílian Lund Amado. E-mail: lilian.amado@gmail.com; lla@ufpa.br; Telefone: +55 91 991765500. Laboratório de Ecotoxicologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. Av. Augusto Corrêa, 01, Guamá, 66075110. Belém, Pará, Brasil.

Destaques

- Foram desenvolvidas técnicas de registros eletrocardiográficos (ECG) na *Crassostrea gasar*;
- Exposição aérea afetou a função cardíaca de *C. gasar*;
- O ECG de ostras emersas apresentou duas fases;
- As ostras apresentaram arritmia na fase I e bradicardia na fase II;
- A bradicardia indica diminuição do metabolismo como estratégia de sobrevivência

Resumo

Caracterizamos os registros basais do ECG de *Crassostrea gasar* sob imersão e avaliamos os efeitos da exposição aérea sobre a atividade cardíaca das ostras por meio dos parâmetros cardíacos. Foram analisadas a potência espectral da frequência cardíaca ($\text{mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$), amplitude (mV), frequência cardíaca em batimentos por minuto (BPM), duração do complexo QRS (s) e os intervalos P-Q (s) e R-R (s) nas ostras imersas e emersas durante 30 min. As ostras imersas na água apresentaram o traçado do ECG normal e regular com ritmo sinusal sem alterações com todas as ondas e intervalos. Já as ostras do grupo emerso, o traçado do ECG manteve o ritmo sinusal, mas com modificações nos padrões do traçado como período isométrico prolongado e apresentou duas fases. Na fase I, a frequência cardíaca e a potência espectral aumentaram e conseqüentemente o intervalo R-R diminuiu. Na fase II, a frequência cardíaca e a potência espectral diminuíram e, conseqüentemente o intervalo R-R aumentou. O complexo QRS das ostras emersas diminuiu em ambas as fases em comparação ao grupo imerso. O intervalo P-Q foi semelhante em ambos os grupos experimentais indicando que após atividade atrial o tempo para ativação ventricular foi mantido nas ostras. Concluímos que a exposição aérea afetou a função cardíaca de *C. gasar*, a arritmia nas ostras em resposta ao início da exposição aérea foi para manter o suprimento de oxigênio e a bradicardia ocorreu para diminuir o metabolismo como estratégia de sobrevivência.

Palavras-chave: Eletrocardiograma; estuário; exposição aérea; bivalve

1. Introdução

Muitos bivalves são espécies de aquicultura economicamente importante ao redor do mundo, representando 22,8% de produtos aquáticos no mercado (Moffitt e Cajas-Cano, 2014). Os bivalves são organismos que vivem em zona interdital marinha, área da costa marcada pela maré alta e baixa (Varela et al., 2007), estando tanto em ambiente aquático como terrestre (Connor e Gracey, 2012). Muitos bivalves marinhos possuem mecanismos para garantir a sua sobrevivência sob essas constantes mudanças do meio (Borković-Mitić et al., 2013). Um desses mecanismos é a capacidade de abrir e fechar as suas válvulas, de modo a se adequar ao meio frente as suas constantes variações (Sokolov e Sokolova, 2019). Esse comportamento fornece proteção de curto prazo contra estresse osmótico, separando o fluido interno do ambiente externo (Pourmozaffar et al., 2020). Mas sabe-se que, essa habilidade compromete o desenvolvimento dos bivalves, uma vez que a alimentação não ocorre durante esse tempo, além da diminuição da sua taxa de respiração (Solanc, 2016). Além disso, com o retorno dos batimentos cardíacos à normalidade, quanto há nova imersão, é possível que os organismos desenvolvam um processo conhecido como síndrome da isquemia-reperfusão (Barzegar et al., 2019). Essa síndrome caracteriza-se gerar estresse oxidativo, uma vez que ocorre uma oxigenação intensa da hemolinfa no retorno da perfusão somada ao acúmulo, durante a isquemia, de xantina e hipoxantina (subprodutos da degradação anaeróbica do ATP), que quando oxidados geram uma grande concentração de espécies reativas de oxigênio (Eltzschig e Eckle, 2011). Essa condição também tem o potencial de afetar o desenvolvimento dos animais, o que é particularmente importante para ambientes de cultivo.

Organismos de zona entremarés expostos ao ar por até 50% do tempo em níveis mais baixos da costa (período de privação da água), a exposição aérea aumenta a intensidade do estresse (Moyen et al., 2019). O estresse pode desencadear uma redução da taxa metabólica, bem como ocasionar uma rápida diminuição da atividade cardíaca (Gracey e Connor, 2016). Estudos ainda tem revelado que invertebrados que sofrem qualquer tipo de estresse ambiental atingiram o pico de frequência cardíaca (FC) seguido por uma queda repentina (Dong e Williams, 2011). Nesse contexto, é necessário o uso de ferramentas para avaliar os efeitos causados durante o tempo em que os organismos se encontram em imersão aquática e emersão, sob exposição aérea. Uma ferramenta valiosa nesse sentido é o eletrocardiograma, que avalia a atividade cardíaca e auxilia no melhor entendimento do estado fisiológico dos organismos (Xing et al., 2019).

O eletrocardiograma (ECG) consiste na gravação dos impulsos elétricos que são gerados enquanto o coração está em contração, representando a soma dos potenciais de ação do coração que provêm da superfície do corpo (Goldberger et al., 2017). No ECG, além da FC que fornece informações valiosas sobre a atividade cardíaca, também é possível analisar as ondas P, Q, R, S e T do ritmo sinusal e os seus intervalos R-R, P-Q, QRS, ST e QT que determinam informações sobre o músculo cardíaco dos organismos (Sheffield et al., 1969). Avaliar esses parâmetros em bivalves sob as variações naturais nos auxilia no entendimento das respostas fisiológicas dos organismos frente a essas constantes variações naturais de marés (Logan et al., 2012). O coração dos bivalves é semelhante aos vertebrados, cada compartimento cardíaco é constituído de miócitos que se contraem simultaneamente, resultando assim em batimentos cardíacos de bombeamento da hemolinfa funcional (Kodirov, 2011).

Nesse estudo usamos como organismo modelo a ostra-do-mangue *Crassostrea gasar* para medir as respostas cardíacas. A ostra-do-mangue *C. gasar* é naturalmente encontrada em ambientes estuarinos, tendo como seu habitat natural regiões de manguezais, onde vive fixa em raízes do mangue ou em rochas, locais que sofrem influências das variações de marés (Varela et al., 2007). As ostras são importantes fontes de renda para a população costeira, sendo extraídas de seu ambiente natural para venda e consumo local (Ramos et al., 2014). O cultivo de ostra na região amazônica é uma atividade aquícola que gera renda, que contribui para conservação dos estuários, diminuindo a pressão sobre os estoques naturais e assim permitindo uma exploração mais sustentável (Guimarães et al., 2010). Estudos têm evidenciado que variações das condições ambientais como variações de maré afetam diretamente o cultivo de ostras (Letendre et al., 2008). Logo o uso do ECG em ostras de cultivo transmitirá informações sobre a sobrevivência desses organismos e de que modo se adaptam frente às mudanças da maré no ambiente (Cajaraville et al., 2013; Chapperon et al., 2016). Esse estudo é o primeiro que avalia o funcionamento cardíaco *in vivo* em *C. gasar*.

Levantamos a hipótese de que as ostras sob imersão aquática mantêm sua atividade cardíaca e que ostras sob exposição aérea modulam sua atividade cardíaca como estratégia de sobrevivência. Diante disso, caracterizamos os registros basais do ECG de *C. gasar* sob imersão e avaliamos os efeitos da exposição aérea sobre a atividade cardíaca das ostras por meio dos seguintes parâmetros cardíacos: potência espectral da frequência cardíaca ($\text{mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$), amplitude (mV), frequência cardíaca em batimentos por minuto (BPM), duração do complexo QRS (s) e intervalos P-Q (s) e R-R (s).

2. Material e métodos

2.1. Coleta e aclimação das ostras

Ostras adultas da espécie *C. gasar* foram adquiridas de um banco sementeiro na Reserva extrativista Marinha Mãe Grande de Curuçá, Pará, Brasil (licença do governo federal SISBIO-ICMBIO nº 71444-1). Os animais (n=6; comprimento $8,5\pm 4,1$ cm; largura $2,8\pm 0,1$ cm; altura $6,1\pm 0,1$ cm e peso $71,6\pm 62,2$ g) foram aclimatados durante 7 dias em aquário de vidro (35 x 30 x 35 cm; 36 L) com filtro biológico e aeração constante, no Biotério de experimentação do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais da Universidade Federal do Pará (UFPA). A aclimação inicialmente ocorreu em água do estuário (salinidade 10 ppm) e gradativamente foi trocada por água salgada sintética com salinidade 20 ppm – valor ideal para sobrevivência e crescimento de *C. gasar* (Funo et al., 2015). Os parâmetros da qualidade da água foram mantidos e monitorados por meio de sonda multiparamétrica (HORIBA®) – temperatura (25 ° C), oxigênio dissolvido (5,0 mg/L); pH (7,5) e salinidade (20).

2.2 Confeção e coordenadas para implementação do eletrodo

Para captação da atividade elétrica cardíaca das ostras foram confeccionados eletrodos contendo duas hastes de aço inoxidável, fixadas com solda a um conector e conjugadas a uma distância de 2,5 mm, com as dimensões em comprimento de 17 mm e com a ponta em esfera medindo 1mm de diâmetro. As hastes foram fixadas em uma base com pinos conectores representando o polo positivo e negativo para conexão ao amplificador (Fig.1 A).

Para o implante dos eletrodos as ostras foram colocadas em um plano cartesiano com a ordenada tangenciando para o bordo anterior do ligamento, traçando uma reta do ponto A para o ponto B (Fig. 1B). Como foi observado um padrão para todos os animais em relação a posição do coração, foi obtido um índice de proporcionalidade o índice 0,6315, no qual foi multiplicado pelo comprimento total das ostras na direção A para B, indicando o ponto que deveria ser inserido o eletrodo (Fig. 1 B, seta).

Após a identificação do local, as ostras foram perfuradas com uma broca odontológica para a instalação do implante, com posterior fixação do eletrodo com acrílico autopolimerizável (Fig. 2 A e B). Em seguida, as ostras permaneceram com o eletrodo por 24 h para posterior aquisição dos registros eletrocardiográficos.

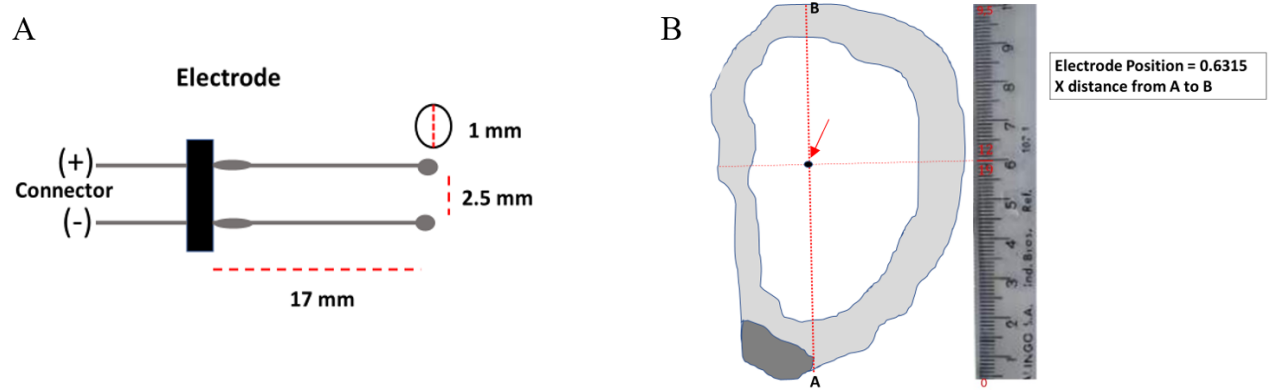


Figura 1. Confeção e coordenadas para implementação do eletrodo em *Crassostrea gasar*. A) Modelo esquemático das dimensões dos eletrodos; B) Coordenada para implantação do eletrodo. A seta em vermelho mostra o local onde foi feita a perfuração.

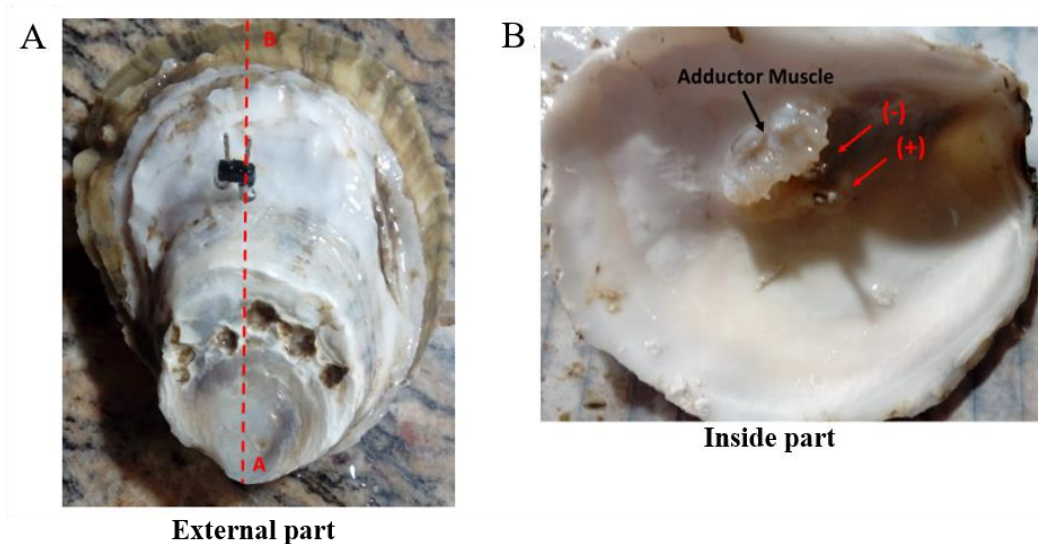


Figura 2. Implementação do eletrodo em *Crassostrea gasar*. A) Fixação com o acrílico autopolimerizável na parte externa. A linha tracejada mostra a coordenada e aplicação do índice; B) Posicionamento interno do eletrodo em relação ao músculo adutor. As setas em vermelho mostram os eletrodos (polos positivo e negativo) e a seta preta mostra a posição do músculo adutor.

2.3 Análise dos registros eletrocardiográficos

Os registros eletrocardiográficos foram analisados inicialmente nas ostras imersas na água durante 30 min para avaliar os registros basais (Grupo imerso). Em seguida, os animais foram retirados da água (Grupo emerso) e o eletrocardiograma foi analisado por mais 30 min para avaliar a atividade cardíaca sob exposição aérea. Todo o experimento foi realizado em uma gaiola metálica de Faraday (TMC).

Os eletrodos foram ligados a um sistema de aquisição de dados digital por meio de um amplificador diferencial de alta impedância de entrada (Grass Technologies, Modelo P511), ajustado com filtragem de 0,3 e 300 Hz, com uma amplificação de 2000X e monitorados com um osciloscópio (ProteK, Modelo 6510). Os registros foram monitorados continuamente com uma faixa de 1 KHz (National Instruments, Austin, TX), armazenados em um disco rígido e posteriormente processados através de um software especializado (LabVIEW express) (Fig. 3).

Os sinais elétricos dos registros foram observados em 1000 amostras por segundo. As análises dos sinais adquiridos foram possíveis com auxílio de uma ferramenta de linguagem de programação versão 2. As bibliotecas Numpy e Scipy foram usadas para o processamento matemático e a biblioteca Matplotlib foi utilizada para elaboração dos gráficos. A interface gráfica foi desenvolvida utilizando a biblioteca PyQt4 de acordo com Cantanhêde et al. (2020). Os seguintes parâmetros cardíacos foram analisados: potência espectral da frequência cardíaca em $\text{mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, frequência cardíaca em batimentos por minuto (BPM), amplitude dos traçados (mV), duração do complexo QRS (s) e dos intervalos P-Q (s) e R-R (s).

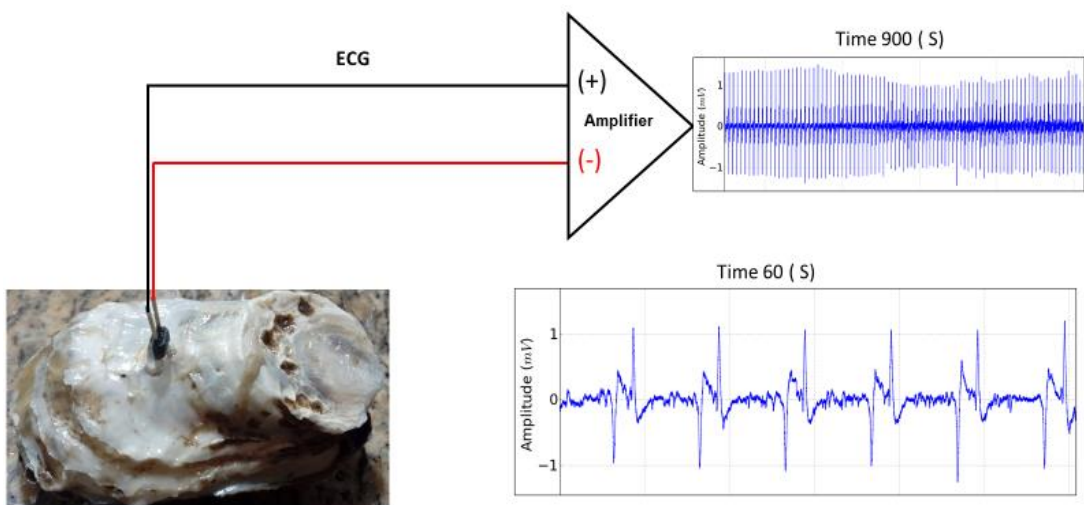


Figura 3. Aquisição do sinal cardíaco de *Crassostrea gasar* mostrando os eletrodos ligados ao amplificador. Os registros têm duração de 900 segundos e a amplificação de 60 segundos.

2.5. Análise estatística

Após verificar os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias, por meio dos testes de Kolmogorov-Sminov e Levene respectivamente, a comparação das médias

dos registros foram feitas através de ANOVA um critério, seguida do teste de Tukey. O software GraphPad Prism[®] 8 foi utilizado para as análises e o valor de $p < 0,01$ foi considerado estatisticamente significativo em todos os casos.

3. Resultados

3.1 Eletrocardiograma de ostra-do-mangue *Crassostrea gasar*

O traçado do eletrocardiograma basal (ECG) dos espécimes imersos de *C. gasar* apresentou ritmo sinusal sem alterações com todas as ondas e intervalos (Fig. 4 A e B): a onda P (atividade atrial), o complexo QRS (despolarização ventricular), a onda T (repolarização ventricular) e os intervalos RR (tempo entre dois complexos QRS sucessivos) e PQ (medida e tempo para atividade atrial e início da atividade ventricular). O ritmo sinusal das ostras imersas apresentou médias de amplitude do traçado de $1,299 \pm 0,1060$ mV e frequência cardíaca de $6,33 \pm 0,5164$ BPM (Fig. 6 A e B).

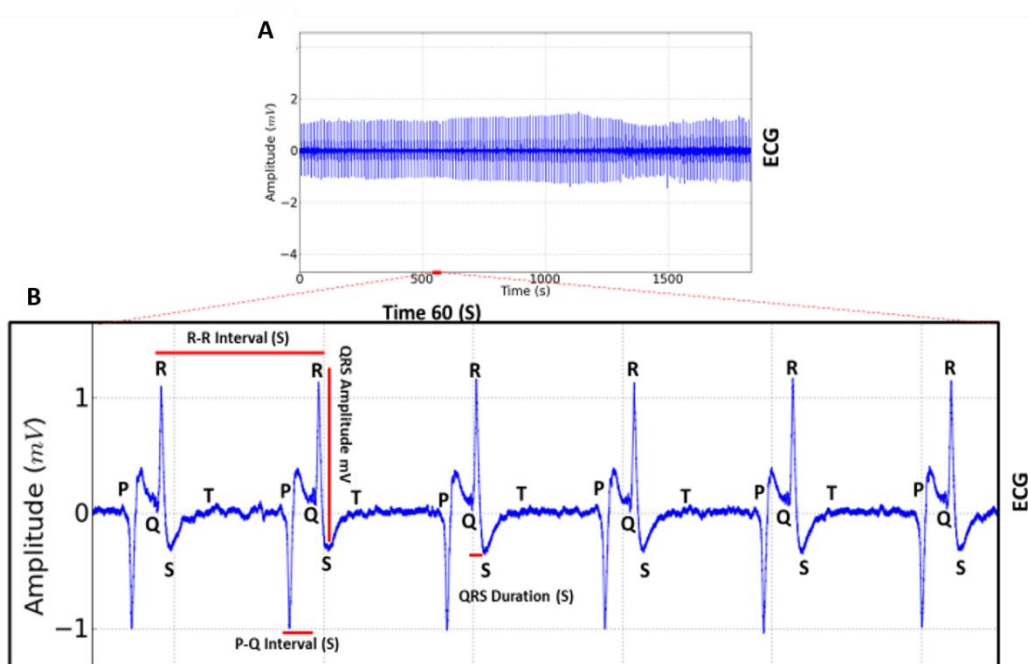


Figura 4: Eletrocardiograma (ECG) normal de *Crassostrea gasar* (n=6) do grupo imerso. A) ECG basal durante 30 minutos; B) ECG ampliado em 60s mostrando a Frequência cardíaca (BPM), Amplitude (mV), Intervalos R-R (s) e P-Q, Duração e amplitude do complexo QRS (s).

Durante a exposição aérea de *C. gasar*, o traçado do ECG manteve o ritmo sinusal, mas com modificações nos padrões do traçado apresentando duas fases (Fig. 5 C). Na primeira fase a amplitude do traçado ($1,141 \pm 0,2095$ mV) foi semelhante ao do grupo imerso, mas ocorreu

aumento da frequência cardíaca ($9,833 \pm 0,9832$ BPM) durante 12 minutos (Fig. 6 A e B). Na segunda fase, a amplitude ($0,8622 \pm 0,07710$ mV) e a frequência cardíaca ($3,667 \pm 0,8165$ BPM) diminuíram comparado ao grupo imerso e à fase I (Fig. 6 A e B), com período de funcionamento da atividade cardíaca seguido de um período isométrico prolongado no traçado (Fig. 5 E, seta) [Frequência: $F(2, 15) = 90,61$; $P < 0,01$; amplitude: $F(2, 15) = 14,42$; $P < 0,01$].

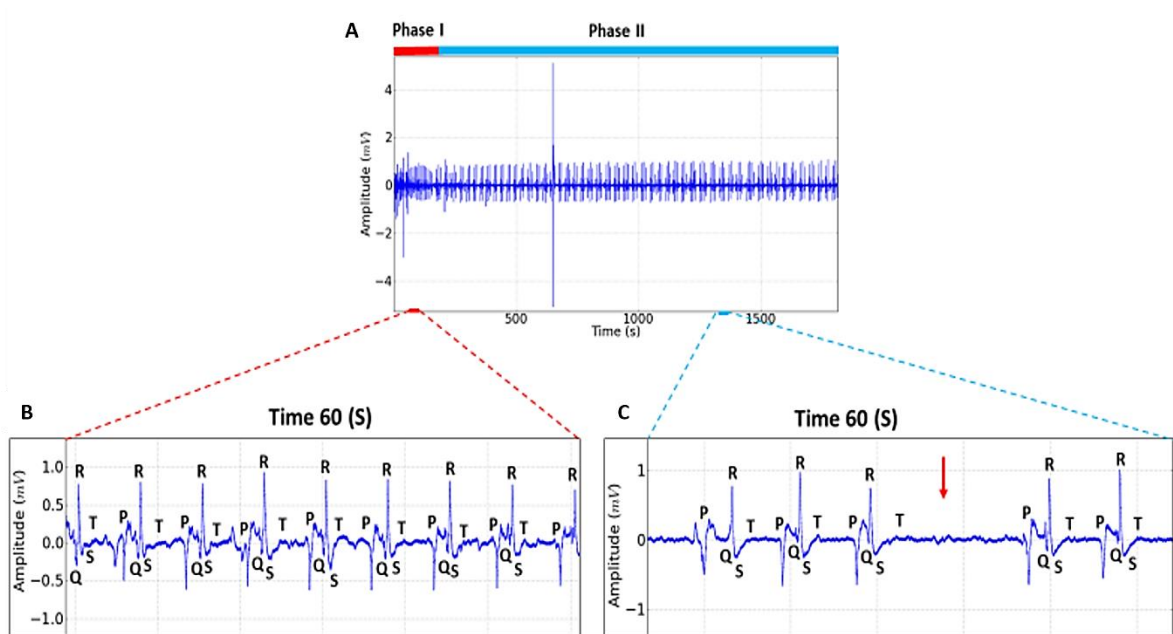


Figura 5. Eletrocardiograma (ECG) de *Crassostrea gasar* (n=6) do grupo emerso. A) ECG durante 30 minutos com duas fases: Fase I (linha em vermelho) e Fase II (linha em azul); B) ECG do grupo emerso ampliado em 60 s da Fase I com identificação das ondas cardíacas (linha tracejada em vermelho); C) ECG do grupo emerso ampliado em 60 s da Fase II (linha tracejada em azul) mostrando o período isométrico (seta em vermelho).

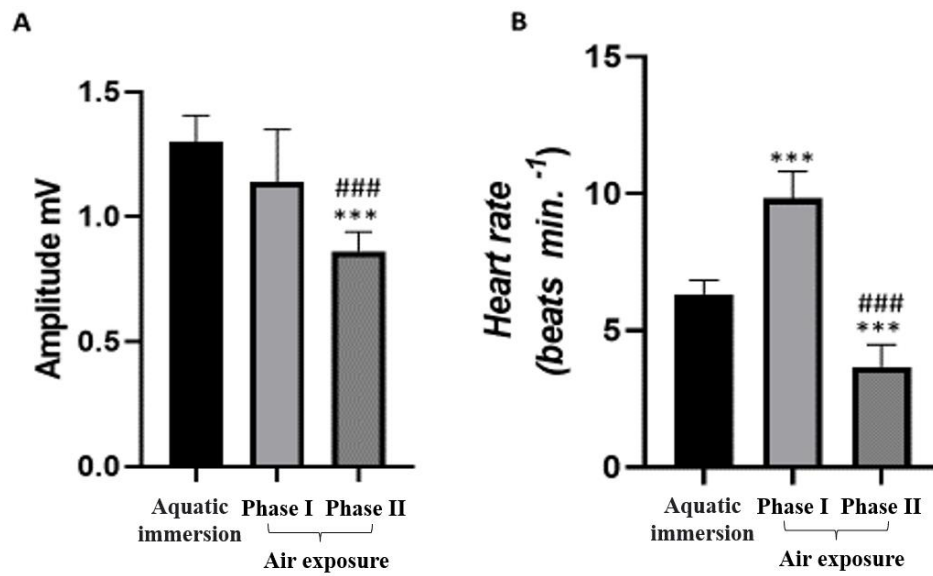


Figura 6: Batimento cardíaco de *Crassostrea gasar* dos grupos imerso e emerso. A) Média da amplitude do complexo QRS; B) Média da frequência cardíaca em batimentos por minuto. (***) indica diferença estatística para o grupo imerso; (###) indica diferença estatística para a fase I do grupo emerso ($p < 0,01$, $n = 6$).

Na avaliação da potência espectral da função cardíaca das ostras foi observado aumento da intensidade e energia nas frequências abaixo de 10 Hz nas ostras do grupo imerso, com média $60,48 \pm 4,190 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ (Fig. 7 A e C). Nas ostras emersas da primeira fase a intensidade e energia permaneceu alta ($57,51 \pm 8,732 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) em consequência da alta frequência cardíaca encontrada nessa fase. Já as ostras emersas da segunda fase esse parâmetro diminuiu ($21,26 \pm 5,438 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) [$F(2, 15) = 69,57$; $P < 0,01$] (Fig. 7 B e C), indicando uma baixa atividade cardíaca em decorrência das alterações observadas no ECG dessa fase, como a baixa frequência cardíaca e os períodos isoelétricos no traçado.

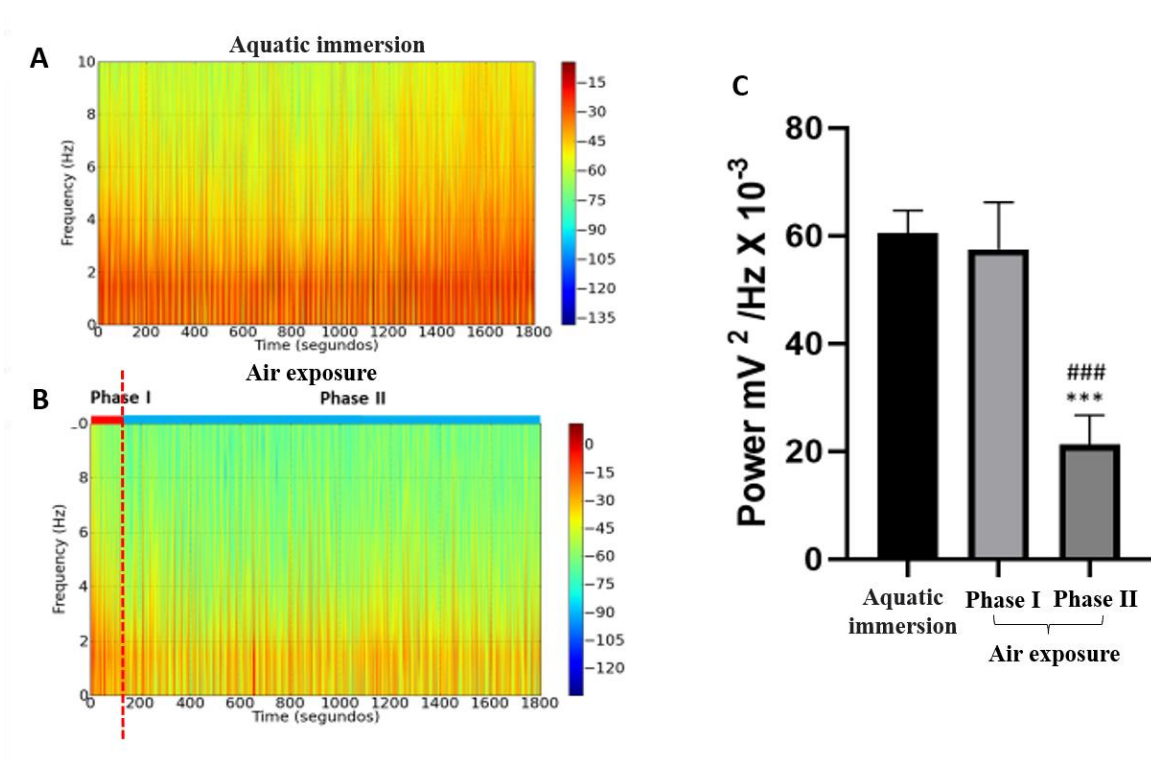


Figura 7. Espectrograma da frequência cardíaca em 30 minutos de *Crassostrea gasar* dos grupos imerso e emerso mostrando a intensidade do sinal (escala colorimétrica) ao longo do tempo em frequências de até 10 Hz. A) Espectrograma das ostras imersas; B) Espectrograma das ostras emersas mostrando as fases I e II separadas por linha tracejada em vermelho; C) Amplitude média de potência em escala linear (***) indica diferença estatística para o grupo imerso (###) indica diferença estatística para a fase I do grupo emerso ($p < 0,01$, $n = 6$).

Em relação aos intervalos médios das ondas do ECG, os intervalos P-Q e R-R das ostras imersas se mantiveram regulares com médias de $2,096 \pm 0,06216$ e $11,03 \pm 0,6297$ segundos, respectivamente (Fig. 8 A e C). Na avaliação do ECG das ostras do grupo emerso, o intervalo P-Q de ambas as fases (Fig. 8 A) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo imerso (Fase I: $1,908 \pm 0,1279$ s, Fase II: $2,448 \pm 0,6495$ s) [$F(2, 15) = 3,058$; $P = 0,0769$]. O intervalo R-R (Fig. 8C) das ostras emersas da fase I ($5,863 \pm 2,007$ s) diminuiu em relação as ostras do grupo imerso, em consequência da alta frequência cardíaca dos animais nessa fase. Na fase II, observou-se o oposto, com aumento desse parâmetro ($14,83 \pm 2,927$ s) em consequência da baixa frequência cardíaca nessa fase [$F(2, 15) = 28,08$; $P < 0,01$].

A média do complexo QRS das ostras emersas diminuiu em ambas as fases (Fase I: $0,5687 \pm 0,1264$ s; Fase II: $0,6238 \pm 0,05539$ s) em comparação ao grupo imerso ($0,7862 \pm 0,09169$ s) [$F(2, 15) = 8,382$; $P = 0,0036$], mostrando que a exposição aérea afetou o funcionamento cardíaco em ambas as fases (Fig. 8 B).

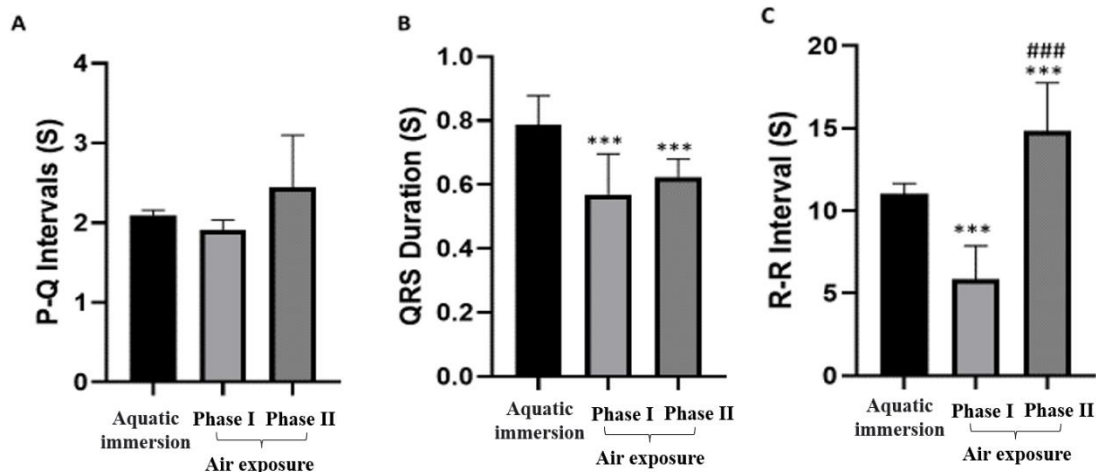


Figura 8. Intervalos das ondas do eletrocardiograma de *Crassostrea gasar* dos grupos imerso e emerso. A) Média do intervalo P-Q; B) Média da duração do complexo QRS; C) Média do intervalo R-R. (***) indica diferença estatística para o grupo imerso; (###) indica diferença estatística para a fase I do grupo emerso ($p < 0,01$, $n = 6$).

4. Discussão

A partir do eletrocardiograma (ECG) é possível capturar o registro contínuo da atividade cardíaca dos bivalves que são expostos ao ar nas zonas entremarés, tanto em habitat natural quanto em laboratório (Gurr et al., 2018). No entanto, a maioria dos estudos abordam apenas a frequência cardíaca (FC), pois é considerado um bom indicador do estado fisiológico em vários animais e é relativamente estável e fácil de calcular (Xing et al., 2019). Em nosso estudo, além da FC usamos outros parâmetros do ECG (as ondas e seus intervalos) que contribuirá para uma compreensão mais abrangente da atividade cardíaca de ostras. *C. gasar* sob condições experimentais de imersão e emersão mostraram diferença nas respostas eletrocardiográficas. A atividade cardíaca das ostras imersas foi normal e regular no tempo experimental, mas as ostras sob exposição aérea apresentaram alterações no ritmo sinusal e no traçado, afetando o funcionamento cardíaco.

Nas ostras da primeira fase do grupo emerso ocorreu o aumento da frequência cardíaca (FC) e consequentemente a diminuição do intervalo R-R no ritmo sinusal, o que caracteriza uma arritmia nesses animais. Mas, esse quadro de arritmia permaneceu por um curto período. Como essa fase inicia a transição de ambientes, o batimento cardíaco das ostras acelerou provavelmente como resposta para uma maior circulação de hemolinfa no corpo das ostras para aumentar o transporte de oxigênio para os tecidos, pois, o oxigênio dissolvido na água retida dentro das válvulas se esgota em minutos e a hipóxia se inicia (Bayne, 1976). Além disso, as ostras permanecem com as válvulas fechadas, o que impede o acesso ao oxigênio ambiental.

No ambiente natural como nos estuários amazônicos ocorre as grandes marés semidiurnas com período de aproximadamente 12 h, apresentando duas preamares e duas baixa-mares ao longo de um dia lunar com amplitudes de maré de mais de 3 m (Miranda et al., 2002). Durante ciclos de maré, os bivalves sésseis utilizam o oxigênio atmosférico que se difunde no fluido da cavidade do manto, de onde é removido pelas brânquias para a respiração (Connor e Gracey, 2012). Mas em laboratório, essa eficiência diminui, como observado no estudo de Willson e Burnett (2000) em que a captação de oxigênio pela ostra *Crassostrea virginica* sob condições aéreas foi inferior a 0,1% de sua absorção de oxigênio.

O início da hipóxia desencadeia uma redução na taxa metabólica (de Zwaan, 1996), o que foi observado nas ostras sob emersão aérea a partir de 12 min de exposição, pois as ostras apresentaram frequência cardíaca reduzida e conseqüentemente um aumento do intervalo R-R no ritmo sinusal, o que caracteriza bradicardia nesses animais. Como a frequência cardíaca pode ser usada como uma medida da função metabólica e fisiológica de bivalves (Campbell et al., 2007), sugerimos que o batimento cardíaco desacelerou nos animais para diminuir o metabolismo em exposição aérea. O mesmo acontece no ambiente natural, uma estratégia comumente usada por bivalves entre marés durante a exposição aérea é uma redução no consumo de oxigênio, diminuindo o metabolismo, pois em condições naturais as ostras experimentam mudanças nos níveis de oxigênio disponível associados ao ciclo das marés (Connor e Gracey, 2011).

Resultados semelhantes foram encontrados por Gurr et al.(2018) em um estudo experimental de laboratório, onde mediram a atividade cardíaca da ostra *Argopecten irradians* em resposta à hipóxia *in-situ* de ciclo diário durante períodos de um mês e observaram um aumento na frequência cardíaca em resposta a quedas iniciais de oxigênio abaixo de 5 mg.L. Em concentrações ainda mais baixas (2 mg O₂/L), as taxas de batimento cardíaco diminuíram, atingindo um estado de bradicardia durante a anóxia.

Associado a isso, na fase II as ostras também apresentaram período isoelétrico prolongado no traçado cardíaco, ou seja, a exposição aérea causou uma supressão da atividade cardíaca por alguns períodos. O traçado do coração variou consideravelmente nessa fase, com evidência de batimento contínuo do coração seguido de uma cessação gradual da atividade cardíaca. Provavelmente essa alteração ocorreu para diminuir o ritmo cardíaco, como uma estratégia de sobrevivência em condições aéreas. Uma outra alteração observada no ritmo sinusal das ostras emersas foi a diminuição do complexo QRS em ambas as fases, mostrando que a exposição aérea afetou a contração ventricular. Mas, o intervalo P-Q se manteve, tanto

no ECG das ostras emersas quanto das imersas, mostrando que após a atividade atrial o tempo para ativação ventricular foi mantido nas ostras de ambos os grupos experimentais. Logo, sugerimos que as alterações observadas no ECG de *C. gasar* podem ser revertidas em caso de reimersão e a atividade cardíaca normal pode ser retomada. Por outro lado, essa retomada da atividade cardíaca promoveria a volta da circulação de hemolinfa no coração necessária para recuperação da função celular, promovendo eventos de isquemia-reperfusão o que desencadeia uma resposta inflamatória sistêmica que pode levar as lesões celulares e até falência no coração (Kalogeris et al., 2012). Além disso, ocorrerá a reintrodução do oxigênio molecular (O₂) no coração, produzindo espécie reativas de oxigênio, altamente lesivos às células e que podem iniciar uma reação inflamatória sistêmica grave (Dhalla et al., 2000).

Concluimos que a exposição aérea afetou a função cardíaca de *C. gasar*, a arritmia nas ostras em resposta ao início da exposição aérea foi para manter o suprimento de oxigênio e a bradicardia ocorreu para diminuir o metabolismo como estratégia de sobrevivência. A partir dos nossos resultados, é necessário estudos futuros para avaliar o funcionamento cardíaco de *C. gasar* sob reimersão e avaliar as respostas cardíacas por um maior tempo experimental. Além disso, esses resultados direcionam a necessidade de avaliarmos como funciona a síndrome de isquemia e reperfusão nesta espécie, uma vez que, caso ocorra pode afetar o desenvolvimento dos organismos de cultivo e poderia ser útil para definir áreas de cultivo de ostras com menor tempo de exposição aérea.

Referências

- Barzegar, M., Kaur, G., Gavins, FNE., WangY., Boyer, CJ., Alexander, JS., 2019. Potential therapeutic roles of stem cells in ischemia-reperfusion injury. *Stem Cell Research*. 37, 101421. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101421>
- Bayne, BL. *Marine Mussels Their Ecology and Physiology*. International Biological Programme Synthesis. p, 528, 2009.
- Borković-Mitić, S., Pavlović, S., Perendija, B., Despotović, S., Gavrić, J., Gačić, Z., Saičić, Z., 2013. Influence of some metal concentrations on the activity of antioxidant enzymes and concentrations of vitamin e and SH-groups in the digestive gland and gills of the freshwater bivalve *Unio tumidus* from the Serbian part of Sava River. *Ecological Indicators*. 32, 212-221. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.03.024>
- Burnett, NP., Seabra, R., De Pirro, M., Wethey, DS., Woodin, SA., Helmuth, B., Zippay, ML., Sarà, G., Monaco, C., Lima, FP., 2013. An improved noninvasive method for measuring heartbeat of intertidal animals. *Limnology and Oceanography: Methods*. 11, 91-100. <https://doi.org/10.4319/lom.2013.11.91>
- Cajaraville, MP., Bebianno, MJ., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. *Science of the Total Environment*. 247, 295-311. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00499-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00499-4)
- Cantanhêde, SM., Hamoy, M., Montag, LFdeA., Amado, LL., 2020. Electrophysiological responses in Amazonian fish species *Bryconops caudomaculatus* (Osteichthyes: Characiformes) as biomarkers of xenobiotic toxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. 228, 108653 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108653>
- Chapperon, C., Volkenborn, N., Clavier, J., Séité, S., Seabra, R., Lima, FP., 2016. Exposure to solar radiation drives organismal vulnerability to climate: Evidence from an intertidal limpet. *Journal of Thermal Biology*. 57, 92-100. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2016.03.002>
- Connor, KM., Gracey, AY., 2012. High-resolution analysis of metabolic cycles in the intertidal mussel *Mytilus californianus*. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 302, 103-R111 <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00453.2011>
- Connor, KM., Gracey, AY., 2011. Circadian cycles are the dominant transcriptional rhythm in the intertidal mussel *Mytilus californianus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108, 16110-16115. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111076108>
- De Zwaan, A., Eertman, RHM., 1996. Anoxic or aerial survival of bivalves and other euryoxic invertebrates as a useful response to environmental stress—A comprehensive review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 113, 299-312. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(95\)02101-9](https://doi.org/10.1016/0742-8413(95)02101-9)
- Dhalla, NS., Elmoselhi, AB., Hata, T., Makino, N., 2000. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular Research*. 47, 446-456. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00078-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00078-X)

- Dong, YW., Williams, GA., 2011. Variations in cardiac performance and heat shock protein expression to thermal stress in two differently zoned limpets on a tropical rocky shore. *Marine Biology*. 158, 1223-1231. <https://doi.org/10.1007/s00227-011-1642-6>
- Eltzschig, HK., Eckle, T., 2011. Ischemia and reperfusion-from mechanism to translation. *Nature Medicine*. 17, 1391-1401. <https://doi.org/10.1038/nm.2507>
- Funo, ICSA., Antonio, ÍG., Marinho, YF., Gálvez, AO., 2015. Influence of salinity on survival and growth of *Crassostrea gasar*. *Boletim do Instituto de Pesca*. 41, 837-847. <https://doi.org/10.32360/acmar.v41i1.6084>
- Goldberger, AL., Goldberger, ZD., Shvilkin, A., 2017. Book Review: Goldberger's Clinical Electrocardiography. A Simplified Approach. *Perfusion*. 28, 170, 9^a edition.
- Gracey, AY., Connor, K., 2016. Transcriptional and metabolomic characterization of spontaneous metabolic cycles in *Mytilus californianus* under subtidal conditions. 30, 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2016.07.004>
- Guimarães, AS., Travassos, P., Souza Filho, PWME., Gonçalves, FD., Costa, F., 2010. Impact of aquaculture on mangrove areas in the northern Pernambuco Coast (Brazil) using remote sensing and geographic information system. *Aquaculture Research*. 41, 828-838 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02360.x>
- Gurr, SJ., Goleski, J., Lima, FP., Seabra, R., Gobler, CJ., Volkenborn, N., 2018. Cardiac responses of the bay scallop *Argopecten irradians* to diel-cycling hypoxia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 500, 18-29. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2017.12.011>
- Kalogeris, T., Baines, CP., Krenz ,M., Korthuis, RJ., 2012. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 298, 229-317. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7>
- Letendre, J., Chouquet, B., Rocher, B., Manduzio, H., Leboulenger, F., Durand, F., 2008. Differential pattern of Cu/Zn superoxide dismutase isoforms in relation to tidal spatio-temporal changes in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 148, 211-216. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.05.012>
- Logan, CA., Kost, LE., Somero, GN., 2012. Latitudinal differences in *Mytilus californianus* thermal physiology. *Marine Ecology Progress Series*. 450, 93-105 <https://doi.org/10.3354/meps09491>
- Miranda, LB., Castro, MC., Kjerfve, B., 2012. Princípio de oceanografia física de estuários. Editora da Universidade de São Paulo, 426p.
- Moffitt, CM., Cajas-Cano, L., 2014. Blue Growth: The 2014 FAO State of World Fisheries and Aquaculture. *Fisheries* 39. <https://doi.org/10.1080/03632415.2014.966265>
- Moyen, NE., Somero, GN., Denny, MW., 2019 Impact of heating rate on cardiac thermal tolerance in the California mussel, *Mytilus californianus*. *Journal of Experimental Biology*. 222. <https://doi.org/10.1242/jeb.203166>

- Pourmozaffar, S., Tamadoni, JS., Rameshi, H., Sadegh, A., Bagheri, T., Behzadi, S., Gozari, M., Zahedi, MR., Abrari, LS., 2020. The role of salinity in physiological responses of bivalves. *Reviews in Aquaculture*. 12, 1548-1566. <https://doi.org/10.1111/raq.12397>
- Ramos, CDO., Gomes, CHADM., Magalhães, ARM., Santos, AI Dos., Melo, CMR De., 2014. Maturation of the mangrove oyster *Crassostrea gasar* at different temperatures in the laboratory. *Journal of Shellfish Research*. 33, 187-194. <https://doi.org/10.2983/035.033.0118>
- Sheffield, L.T., Holt, J.H., Lester, F.M., Conroy, D. V., Reeves, T.J., 1969. On-line analysis of the exercise electrocardiogram. *Circulation*. 40, 935-944. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.40.6.935>
- Sodikdjon, AK., 2011. The neuronal control of cardiac functions in Molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 160, 102-116. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.06.014>
- Solan, M., Whiteley, NM., 2016. *Stressors in the Marine Environment: Physiological and ecological responses; societal implications*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198718826.001.0001>
- Sokolov, EP., Sokolova, IM., 2019. Compatible osmolytes modulate mitochondrial function in a marine osmoconformer *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Mitochondrion*. 45, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2018.02.002>
- Varela, ES., Beasley, CR., Schneider, H., Sampaio, I., Marques-Silva, NDS., Tagliaro, CH., 2007. Molecular phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. *Journal of Molluscan Studies*. 73, 229-234. <https://doi.org/10.1093/mollus/eym018>
- Willson, LL., Burnett, LE., 2000. Whole animal and gill tissue oxygen uptake in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*: Effects of hypoxia, hypercapnia, air exposure, and infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Journal of Experimental. Marine. Biology and Ecology*. 246, 223-240. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(99\)00183-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(99)00183-5)
- Xing, Q., Zhang, L., Li, Y., Zhu, X., Guo, H., Bao, Z., Wan ,S., 2019. Development of novel cardiac indices and assessment of factors affecting cardiac activity in a Bivalve Mollusc *Chlamys farreri*. *Frontiers in Physiology*.10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00293>

CONCLUSÕES GERAIS

O crescente desenvolvimento da aquicultura mundial deve obrigatoriamente estar vinculada à constante preocupação sobre as mudanças dos fatores ambientais, a base para o desenvolvimento dos organismos cultivados. No caso do cultivo de moluscos bivalves, existe uma preocupação adicional, devido ao fato dos organismos sofrerem com as mudanças ambientais, que afetam sua fisiologia podendo impactar seu desenvolvimento e seu crescimento, o que vai na contramão do sucesso das atividades de cultivo.

Considerando a região amazônica, com a sazonalidade única e as marcantes variações de marés modificam os padrões ambientais e fisiológicos dos organismos residentes, sendo este fato claramente descrito na literatura como características que alteram o comportamento e adaptação e da biota, tornando-se cada vez mais relevantes estudos que visem determinar as respostas bioquímicas e eletrofisiológicas que possam expressar o estado fisiológicos dos organismos de regiões de cultivo.

As áreas de cultivos em estudo possuem características ambientais que possibilitam a criação de ostras *C. gasar*. A região de Lauro Sodré, área mais afastada do oceano, com grandes variações de salinidade por conta das intensas chuvas, ocorre o cultivo de ostra em travesseiros, onde os organismos ficam menos expostos ao ar durante a maré baixa devido à posição mais a dentro do estuário. Já a região de Nazaré do Seco, área mais próxima do oceano, com menos variações de salinidade, no entanto o travesseiro onde as ostras se encontram ficam mais à margem da costa, expondo as ostras por mais tempo no ar, durante a vazante da maré.

Todas essas peculiaridades das áreas de estudos, influenciam no metabolismo oxidativo das ostras em cultivo como mostram os nossos resultados, em que mudanças nos parâmetros ambientais e exposição ao ar alteraram a demanda metabólica da ostra-do-mangue *C. gasar*. Por outro lado, os nossos resultados demonstraram ainda que as ostras apresentam mecanismos adaptativos para lidar com essa alteração.

Assim, o uso integrado de biomarcadores de estresse oxidativo e eletrofisiológicos, constitui uma metodologia apropriada para o diagnóstico e monitoramento de áreas de cultivo, servindo também como um alerta no sentido de orientar os ostreicultores sobre a área a ser selecionada para cultivo de ostras. Ademais, os nossos resultados demonstram a viabilidade de uso da ostra-do-mangue *Crassostrea gasar* para programas de biomonitoramento especialmente em áreas de cultivo.

ANEXO 1

Normas para estrutura do artigo da revista Aquaculture (Capítulo 1)

Subdivisão: divida seu artigo em seções claramente definidas e numeradas.

Introdução: indique os objetivos do trabalho e forneça uma fundamentação adequada, evitando o levantamento detalhado da literatura ou a síntese dos resultados.

Material e métodos: forneça detalhes suficientes para permitir que o trabalho seja reproduzido por um pesquisador independente. Os métodos já publicados devem ser resumidos e indicados por uma referência.

Resultados: os resultados devem ser claros e concisos.

Discussão: deve explorar o significado dos resultados do trabalho, não repeti-los. Evite citações extensas e discussão da literatura publicada.

Conclusões: as principais conclusões do estudo podem ser apresentadas em uma breve seção de Conclusões, que pode ser isolada ou formar uma subseção de uma seção de Discussão ou Resultados e Discussão.

Informações essenciais da página de título:

- **Título:** Conciso e informativo. Evite abreviações e fórmulas sempre que possível.
- **Nomes e afiliações dos autores:** Indique claramente o (s) nome (s) e sobrenome (s) de cada autor e verifique se todos os nomes foram digitados corretamente. Forneça o endereço postal completo de cada afiliação, incluindo o nome do país e, se disponível, o endereço de e-mail de cada autor.
- **Autor para correspondência:** Indique claramente quem irá lidar com a correspondência em todas as fases de avaliação e publicação, também após a publicação.

Destaques: são opcionais, mas altamente encorajados para este periódico. Inclua de 3 a 5 marcadores (máximo de 85 caracteres, incluindo espaços, por marcador).

Resumo: Um resumo conciso e factual é exigido de no máximo 400 palavras.

Palavras-chave: Imediatamente após o resumo, forneça no máximo 6 palavras-chave.

Agradecimentos: Reúna os agradecimentos em uma seção separada no final do artigo antes das referências.

Formatação de fontes de financiamento: Liste as fontes de financiamento desta forma padrão para facilitar a conformidade com os requisitos do financiador.

Legendas das figuras: Certifique-se de que cada ilustração tenha uma legenda. A legenda deve conter um breve título (não na própria figura) e uma descrição da ilustração. Reduza o texto nas próprias ilustrações, mas explique todos os símbolos e abreviações usados.

Tabelas: Envie as tabelas como texto editável e não como imagens. As tabelas podem ser colocadas ao lado do texto relevante no artigo ou em página (s) separada (s) no final. Numere

as tabelas consecutivamente de acordo com sua aparência no texto e coloque as notas da tabela abaixo do corpo da tabela. Seja cauteloso no uso de tabelas e assegure-se de que os dados nelas apresentados não dupliquem os resultados descritos em outra parte do artigo. Evite usar réguas verticais e sombreamento nas células da tabela.

Formatação de referência: não há requisitos rígidos sobre a formatação de referência no momento do envio. As referências podem estar em qualquer estilo ou formato, desde que o estilo seja consistente. O uso do DOI é altamente encorajado

Citações no texto: Autor único: o nome do autor (sem iniciais, a menos que haja ambiguidade) e o ano de publicação; Dois autores: nome de ambos os autores e ano de publicação; Três ou mais autores: o nome do primeiro autor seguido de 'et al.' e o ano de publicação.

ANEXO 2

Normas para estrutura do artigo da revista *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* (Capítulo 2)

Subdivisão: divida seu artigo em seções claramente definidas e numeradas.

Introdução: indique os objetivos do trabalho e forneça uma fundamentação adequada, evitando o levantamento detalhado da literatura ou um resumo dos resultados.

Material e métodos: forneça detalhes suficientes para permitir que o trabalho seja reproduzido por um pesquisador independente. Os métodos já publicados devem ser resumidos e indicados por uma referência.

Resultados: os resultados devem ser claros e concisos.

Discussão: deve explorar o significado dos resultados do trabalho, não repeti-los. Evite citações extensas e discussão da literatura publicada.

Conclusões: as principais conclusões do estudo podem ser apresentadas em uma breve seção de Conclusões, que pode ser isolada ou formar uma subseção de uma seção de Discussão ou Resultados e Discussão.

Informações essenciais da página de título:

- **Título:** Conciso e informativo. Evite abreviações e fórmulas sempre que possível.
- **Nomes e afiliações dos autores:** Indique claramente o (s) nome (s) e sobrenome (s) de cada autor e verifique se todos os nomes foram digitados corretamente. Forneça o endereço postal completo de cada afiliação, incluindo o nome do país e, se disponível, o endereço de e-mail de cada autor.
- **Autor para correspondência:** Indique claramente quem irá lidar com a correspondência em todas as fases de avaliação e publicação, também após a publicação.

Destaques: obrigatórios, eles consistem em uma pequena coleção de pontos que capturam os novos resultados de sua pesquisa, bem como novos métodos que foram usados durante o estudo (se houver). Inclua de 3 a 5 marcadores (máximo de 85 caracteres, incluindo espaços, por marcador).

Resumo: Um resumo conciso e factual é exigido de no máximo 250 palavras.

Palavras-chave: Imediatamente após o resumo, forneça no máximo 5 palavras-chave.

Agradecimentos: Reúna os agradecimentos em uma seção separada no final do artigo antes das referências.

Formatação de fontes de financiamento: Liste as fontes de financiamento desta forma padrão para facilitar a conformidade com os requisitos do financiador.

Legendas das figuras: Certifique-se de que cada ilustração tenha uma legenda. A legenda deve conter um breve título (não na própria figura) e uma descrição da ilustração. Reduza o texto nas próprias ilustrações, mas explique todos os símbolos e abreviações usados.

Tabelas: Envie as tabelas como texto editável e não como imagens. As tabelas podem ser colocadas ao lado do texto relevante no artigo ou em página (s) separada (s) no final. Numere as tabelas consecutivamente de acordo com sua aparência no texto e coloque as notas da tabela abaixo do corpo da tabela. Seja cauteloso no uso de tabelas e assegure-se de que os dados nelas apresentados não dupliquem os resultados descritos em outra parte do artigo. Evite usar régua verticais e sombreamento nas células da tabela.

Formatação de referência: Todas as publicações citadas no texto devem ser apresentadas em ordem alfabética em uma lista seguindo o texto do manuscrito. As referências podem estar em qualquer estilo ou formato, desde que o estilo seja consistente. O uso do DOI é altamente encorajado.

Citações no texto: Autor único: o nome do autor (sem iniciais, a menos que haja ambiguidade) e o ano de publicação; Dois autores: nome de ambos os autores e ano de publicação; Três ou mais autores: o nome do primeiro autor seguido de 'et al.' e o ano de publicação.