

**DORIS SOBRAL MARQUES SOUZA**

**AQUISIÇÃO E ELIMINAÇÃO DE CONTAMINANTES EM  
TECIDOS DE MOLUSCOS BIVALVES**

*Tese submetida ao PPG em  
Biotecnologia e Biociências da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina, em cumprimento a  
requisito parcial para a obtenção do  
título de Doutor em Biotecnologia e  
Biociência, linha de pesquisa  
Patógenos Contaminantes do  
Ambiente Aquático, sob a  
orientação da Professora Doutora  
Célia Regina Monte Barardi.*

**FLORIANÓPOLIS  
2014**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Souza, Doris Sobral Marques  
Aquisição e Eliminação de Contaminantes em Tecidos de  
Moluscos Bivalves / Doris Sobral Marques Souza ;  
orientadora, Célia Regina Monte Barardi - Florianópolis,  
SC, 2014.  
159 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

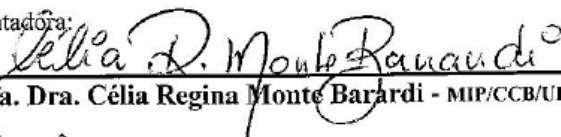
Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Ostras. 3. Virus  
Entéricos. 4. Depuração. 5. Contaminação Ambiental. I.  
Barardi, Célia Regina Monte. II. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e  
Biociências. III. Título.

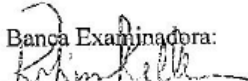
**“Aquisição e eliminação de contaminantes em tecidos de moluscos bivalves”.**  
por

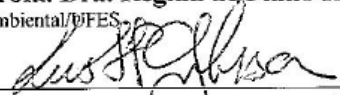
**DORIS SOBRAL MARQUES SOUZA**  
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 011/PPGBT/2014) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

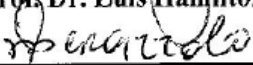
Orientadora:

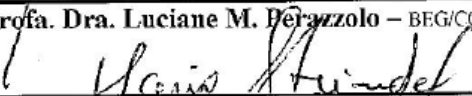
  
**Profa. Dra. Célia Regina Monte Barardi - MIP/CCB/UFSC**

Banca Examinadora:

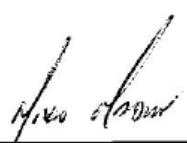
  
**Profa. Dra. Regina de Pinho Keller – Departamento de Engenharia Ambiental/UFES**

  
**Prof. Dr. Luis Hamilton Pospissil Garbossa – EPAGRI/SC**

  
**Profa. Dra. Luciane M. Perazzolo – BEG/CCB/UFSC**

  
**Prof. Dr. Mario Steindel – MIP/CCB/UFSC**

Coordenador:

  
**Prof. Dr. Marcelo Maraschin**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Florianópolis, 14 de maio de 2014.

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, amigo de todas as horas, por me permitir participar deste trabalho, me fazendo perseverar diante dos desafios encontrados.

Aos meus familiares, por sonharem este sonho juntamente comigo. Ao meu esposo Renato, pelo apoio, até mesmo em alguns trabalhos de campo.

A querida orientadora, Profa. Célia Barardi, pelo carinho, pela confiança depositada e pela experiência compartilhada.

A Profa. Cláudia Simões e a todos os colegas do LVA, pelas muitas vezes em que me ajudaram e me incentivaram do decorrer da pesquisa. Gostaria de agradecer especialmente à Vanessa Moresco, Mariana Rangel, Mariana Nascimento, Gislaine Fongaro e Lucas Garcia, pela amizade e pelo auxílio nas análises.

Aos colegas que passaram pelo LVA, nestes quatro anos e que de alguma maneira, contribuíram com esse trabalho.

Ao Adriano Teixeira, pela grande ajuda principalmente na segunda alocação das ostras.

Aos parceiros do Projeto MAPA, em especial ao Prof. Afonso Bairy, Fabrício Flores e Rômi Piazza, por disponibilizarem o local para realizarmos os ensaios de depuração. Ao Diego Leal, do Laboratório de Protozoologia da UNICAMP, pelo empenho na escrita dos nossos artigos.

A todos os professores e alunos do terceiro andar, do MIP, pelo companheirismo. A Profa. Elaine e Prof. Edelson, pela ajuda num momento difícil.

A Joice Ferrari, coordenadora administrativa da Secretaria Integrada do PPG/CCB, pela prontidão em me ajudar.

Aos amigos UFSC que me auxiliaram em diversas partes do trabalho, como Rafael Araújo, Marcelo Nogueira, Dmontier Aragão Raphael Almeida e Irênio Lima Jr.

A Dra. Soizick Le Guyader e a toda equipe do Laboratório de Microbiologia do IFREMER, por me receberem tão bem e por me ajudarem na realização dos experimentos de bioacumulação das ostras com NoV e SAV, também nos experimentos de inativação térmica do RV.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

*...sabendo que a dificuldade produz paciência,  
e a paciência a experiência, e a experiência a  
esperança.*

Romanos 5:3b-4

## Resumo

O consumo de ostras pode ser responsável pela veiculação de doenças para humanos, pois estes animais podem acumular substâncias tóxicas e microrganismos patogênicos em seus tecidos. Vírus entéricos humanos podem apresentar padrões distintos de acumulação nas ostras, dificultando que sejam removidos durante a depuração. Estudos da cinética de decaimento de contaminantes microbiológicos e químicos nas ostras, durante a depuração, são escassos. O objetivo desse trabalho foi estudar a dinâmica de aquisição e eliminação de contaminantes químicos e microbiológicos, no meio ambiente e durante os processos de depuração. Esta pesquisa abrangeu duas etapas distintas, envolvendo a alocação de ostras por 14 dias em quatro locais na baía de Florianópolis-SC: dois liberados ao cultivo (RIB-Ribeirão da Ilha e SAL-Santo Antônio de Lisboa) e dois impróprios (TAP-Tapera e BUC-estuário do rio Bücheler). Na primeira etapa (capítulo I) foi medida a contaminação ambiental destes locais e na segunda (capítulo II), realizada a contaminação (diferentes níveis) das ostras, para que fossem submetidas aos testes de depuração, com diferentes tratamentos (7 dias). No capítulo I foram analisadas: ostras, água e sedimento marinhos dos locais, sendo que as amostras procedentes diretamente do laboratório fornecedor das ostras (Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos/UFSC-LCMM) funcionaram como o tempo zero da contaminação (T0 dia). Foram detectados: (1) Bactérias: *E. coli* na água do mar (acima de 43 UFC/100 mL em TAP e BUC) e *Salmonella* sp. nas ostras (em BUC), por cultura bacteriana; (2) Protozoários: *Cryptosporidium* nas ostras (TAP) e *Giardia* na água do mar (BUC), pela Imunoseparação Magnética e Imunofluorescência tendo esta última sido sequenciada para a confirmação da espécie (*G. duodenalis*); (3) Vírus entéricos: Adenovírus Humano/HADV (nos quatro locais), Vírus da Hepatite A nas ostras (BUC), Norovírus Humano (NoV) GI nas ostras (TAP e BUC) e GII na água do mar (BUC), Poliomavírus-JC nas ostras (LCMM), todos por (RT) qPCR. Também se verificou a ausência de HADV infecciosos nas ostras, por teste de Placa de Lise. (4) Pesticidas Organoclorados; Hidrocarbonetos Alifáticos/HAs e Policíclicos Aromáticos/HPAs; Alquibenzenos Lineares/LABs foram detectados em vários locais, por Cromatografia Gasosa, nas ostras e sedimentos. No capítulo II, somente ostras foram analisadas, antes e durante a depuração. Foram utilizadas lâmpadas UV (18 e 36 W) na descontaminação das águas de depuração e comparadas as cinéticas de

decaimento dos contaminantes nos tecidos das ostras. Parte dos animais de cada local, foi artificialmente contaminada com HAdV2 e Norovírus Murino/MNV-1, funcionando como controles positivos de contaminação viral durante as depurações. Não houve eliminação dos HAdV e protozoários das ostras durante a depuração. MNV-1 foi eliminado após quatro dias de depuração. Também foram detectados HAs, HPAs e LABs, antes e após as depurações. Concluídos os testes, depuradoras com UV 36 W foram disponibilizadas em quatro restaurantes em Florianópolis e realizadas análises virais das ostras depuradas por quatro dias (43 amostras). Somente HAdV foi detectado (uma amostra) e não estava infeccioso. Laudos das análises foram entregues aos comerciantes. As contaminações detectadas ameaçam a produção de ostras em Florianópolis, sendo necessário o aumento na fiscalização nas regiões de cultivo. Embora a depuração tenha removido o MNV-1 (vírus com genoma de RNA, como a maioria dos vírus entéricos humanos veiculados pelas ostras), não eliminou outros patógenos e compostos orgânicos investigados. Além dos ensaios descritos na tese, também foram realizadas outras pesquisas (Apêndice A), referentes à bioacumulação diferencial das espécies de NoV GI e Sapovírus em ostras e inativação termal de Rotavírus em mexilhões durante o cozimento. Estas pesquisas adicionais foram realizadas durante estágio doutoral, 11 meses, no *Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER)*, na França.

**Palavras-chave:** Contaminação. Depuração. Ostras. UV. Vírus entéricos. Bioacumulação viral.

## Abstract

The consumption of oysters may be responsible for transmission of diseases to humans because these animals can accumulate toxic substances and pathogenic microorganisms in their tissues. Human enteric viruses may exhibit distinct patterns of accumulation in oysters, making it difficult to be removed during depuration. Studies of the decay kinetics of microbiological and chemical contaminants in oysters, during depuration, are scarce. The aim of this work was to study the dynamics of acquisition and disposal of chemical and microbiological contaminants in the environment and during the process of depuration. This research comprised two stages, involving the allocation of oysters for 14 days in four locations in the Bay of Florianópolis-SC: two released for cultivation (RIB-Ribeirão da Ilha and SAL-Santo Antonio de Lisboa) and two improper (TAP-Tapera and BUC-Bücheler river estuary). In the first step (Chapter I), environmental contamination of these sites was measured and in the second (Chapter II), held contamination (different levels) of oysters, that were submitted to the depuration tests with different treatments (7 days). In the Chapter I, were analyzed: oyster, seawater and marine sediments. All samples obtained from the oyster supplier (Laboratory of Cultivation of Marine Mollusks/UFSC-LCMM) were considered time zero of contamination (T0 day). Were detected: (1) Bacteria: *E. coli* in seawater (above 43 CFU/100 mL in TAP and BUC) and *Salmonella* sp. in oysters (in BUC) by bacterial culture; (2) Protozoa: *Cryptosporidium* in oysters (TAP) and *Giardia* in seawater (BUC), by Immunomagnetic Separation and Immunofluorescence, and this was also been sequenced to confirm the species (*G. duodenalis*); (3) Enteric Viruses: Human Adenovirus / HAdV (in four locations), Hepatitis A virus in oysters (BUC), Human Norovirus GI (NoV GI) in oysters (TAP and BUC) and GII in seawater (BUC), Polyomavirus-JC in oysters (LCMM), all by (RT) qPCR. It was also verified the absence of infectious HAdV oysters by the Plaque Assay. (4) Organochlorine Pesticides; Aliphatic/AHs and Polycyclic Aromatic/PAHs Hydrocarbons; Linear alkylbenzenes/LABs were detected in several locations, by Gas Chromatography, in oysters and sediments. In Chapter II, only oysters were examined before and during depuration. UV lamps (18 and 36 W) were used in the decontamination of water and the kinetics of decay of contaminants was compared, in the oyster tissues. Part of the animals from each site



was artificially contaminated with HAdV2 and Norovirus Murino/MNV-1, acting as positive controls of viral contamination during the depuration. There was no elimination of HAdV and protozoa from oysters during depuration. MNV-1 was eliminated after four days of depuration. AHs, LABs and PAHs were detected before and after the depurations. After the end of the laboratory tests, the depuration tanks with UV 36 W were allocated in four restaurants, in Florianopolis and viral analyzes of oysters depurated during four days (43 samples) were performed. Only HAdV was detected (one sample) and was not infectious. Reports of analyzes were delivered to traders. The contamination pointed hazards for oyster consumption and showed the importance for continuous surveillance in mollusks growing areas. Although depuration removed the MNV-1 (viruses with RNA genomes, such as most human enteric viruses transmitted by oysters) it did not eliminate other pathogens and organic compounds investigated. In addition to the tests described in the thesis, other research (Appendix A) related to differential bioaccumulation of NoV GI and Sapovirus species in oysters and the thermal inactivation of Rotavirus in mussels during cooking were performed. These additional studies were conducted during the doctoral stage during 11 months, at the *Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer* (IFREMER), France.

**Key-words:** Contamination. Depuration. Oysters. UV. Enteric viruses. Viral bioaccumulation.

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>21</b>
1.1	A EXPANSÃO DO CONSUMO DE MOLUSCOS NO MUNDO E A RELEVÂNCIA DO CULTIVO DA OSTRA DO PACÍFICO EM SANTA CATARINA	21
1.2	O PAPEL DA ÁGUA NA VEICULAÇÃO DE DOENÇAS E O CONTROLE SANITÁRIO DAS FAZENDAS DE MOLUSCOS.....	23
1.2.1	<i>Legislação e maricultura.....</i>	<i>24</i>
1.2.2	<i>O processo de bioacumulação de partículas pelas ostras.....</i>	<i>26</i>
1.2.3	<i>Contaminação química e microbiológica das ostras e dos cultivos</i>	<i>29</i>
1.2.3.1	Compostos orgânicos.....	30
1.2.3.2	Microrganismos patogênicos humanos.....	32
1.2.4	<i>Depuração de moluscos bivalves.....</i>	<i>46</i>
1.2.5	<i>Deteção de vírus em amostras de água e em moluscos.....</i>	<i>50</i>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>51</b>
2.1	GERAL.....	51
2.2	ESPECÍFICOS .....	51
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>52</b>
3.1	DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS DOS CAPÍTULOS I E II.....	52
3.1.1	<i>Capítulo I.....</i>	<i>52</i>
3.1.2	<i>Capítulo II.....</i>	<i>54</i>
3.1.2.1	Depuradoras BWA SC-2.....	57
3.1.2.2	Alocação das ostras para depuração.....	60
3.1.2.3	Bioacumulação de ostras com HAdV2 e MNV-1.....	60
3.1.2.4	Depurações de ostras nos restaurantes.....	62
3.2	PRODUÇÃO DOS ESTOQUES VIRAIS.....	62
3.3	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS .....	66
3.3.1.1	Bactérias .....	67
3.3.1.2	Protozoários .....	67
3.3.1.3	Vírus .....	68
3.3.1.4	Extração dos Ácidos Nucléicos (AN) Virais.....	69
3.3.1.5	Quantificação das Partículas Virais por (RT) qPCR.....	69
3.3.1.6	Análises de Compostos Orgânicos.....	73
3.3.1.7	Análises histológicas.....	73

3.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS .....	74
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO I- ANÁLISE DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL NAS BAÍAS DE FLORIANÓPOLIS, SC .....</b>	<b>75</b>
4.1	RESULTADOS.....	75
4.1.1	<i>Análises Microbiológicas</i> .....	75
4.1.2	<i>Compostos Orgânicos</i> .....	79
4.2	DISCUSSÃO.....	81
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO II- CINÉTICA DA DESCONTAMINAÇÃO QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DURANTE DEPURAÇÃO EM PONTOS DE VENDA DE OSTRAS VIVAS .....</b>	<b>88</b>
5.1	RESULTADOS.....	88
5.1.1	<i>Bioacumulação Viral realizada em laboratório</i> .....	88
5.1.2	<i>Vírus e Protozoários</i> .....	90
5.1.2.1	Ostras após permanência por 14 dias nos locais estudados ....	90
5.1.2.2	Depurações de ostras com Lâmpadas UV de Diferentes Potências. 91	
5.1.2.2.1	Ostras artificialmente contaminadas ( HAdV2 e MNV-1).	91
5.1.2.2.2	Ostras naturalmente contaminadas com HAdV nos 4 locais estudados .....	93
5.1.2.2.3	Ostras Depuradas nos Restaurantes .....	94
5.1.3	<i>Compostos Orgânicos nas ostras</i> .....	95
5.1.4	<i>Alterações teciduais nas ostras</i> .....	96
5.1.4.1	Glândula Digestiva .....	96
5.1.4.2	Brânquias.....	98
5.2	DISCUSSÃO.....	98
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>104</b>
6.1	A CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL.....	104
6.2	ENSAIOS DE DEPURAÇÃO .....	105
<b>7</b>	<b>OUTRAS CONSIDERAÇÕES.....</b>	<b>106</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>108</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>129</b>

APÊNDICE A – ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE ESTÁGIO DOUTORAL, TIPO SANDUÍCHE, NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA DO IFREMER, FRANÇA. ....	129
APÊNDICE B- ARTIGO PUBLICADO COM OS RESULTADOS DO CAPÍTULO I DA TESE.....	151
APÊNDICE C – LAUDO DAS ANÁLISES VIROLÓGICAS CONCEDIDO AOS RESTAURANTES.....	152
APÊNDICE D – ARTIGO PUBLICADO COM OS RESULTADOS DO CAPÍTULO II DA TESE .....	154
APÊNDICE E – CO-AUTORIA EM TRABALHOS PUBLICADOS, OU ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO, EM DECORRÊNCIA DE PARCERIAS ESTABELECIDAS .	155
<b>ANEXOS.....</b>	<b>158</b>
ANEXO A – PARTE DO DOCUMENTO Nº 247, PRODUZIDO APÓS O WORKSHOP ORGANIZADO PELA EPAGRI, COM A PARTICIPAÇÃO DO LVA-UFSC, COMO COLABORADOR EXTERNO. ....	158

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-PRODUÇÃO MUNDIAL DE PESCADO, POR CONTINENTES E POR GRUPOS DE ESPÉCIES (EXCETO PLANTAS), PELA AQUICULTURA, EM 2011, SEGUNDO A FAO (2013).....	21
FIGURA 2-PORCENTAGEM DOS AGENTES ETIOLÓGICOS EM SURTOS ASSOCIADOS À ÁGUA DE CONSUMO. ....	24
FIGURA 3-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS PRINCIPAIS ESTRUTURAS ANATÔMICAS DE UMA OSTRA DA ESPÉCIE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> . ....	27
FIGURA 4-MODELO SIMPLIFICADO DO PROCESSAMENTO DE PARTÍCULAS PELAS OSTRAS. ....	28
FIGURA 5-ESQUEMA DO ADENOVÍRUS, EVIDENCIANDO SUAS ESTRUTURAS E PROTEÍNAS. ....	36
FIGURA 6-ESQUEMA DO ROTAVÍRUS, APRESENTANDO A LOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS QUE COMPÕEM A PARTÍCULA VIRAL. ....	37
FIGURA 7-TAXA DE INCIDÊNCIA DE HEPATITE A POR 100 MIL HABITANTES, EM SANTA CATARINA, NA REGIÃO SUL DO PAÍS E NO BRASIL, DE 1999 A 2010. ....	39
FIGURA 8- (A) REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PARTÍCULA VIRAL DO NoV E DA PROTEÍNA VP1, DO CAPSÍDEO VIRAL (B), DESTACANDO OS DOMÍNIOS S, C E P DESTA PROTEÍNA; (C) ESTRUTURA DO DOMÍNIO P DA PROTEÍNA VP1, COM AS FRAÇÕES P1, EM VERMELHO, E P2, EM AMARELO; (D) REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA GENOMA VIRAL, COMPOSTO POR 3 JANELAS DE LEITURA. ....	40
FIGURA 9-ÁRVORE FILOGENÉTICA REPRESENTANDO OS DIFERENTES GENOGRUPOS DE NOROVÍRUS. ....	41
FIGURA 10-SAPOVÍRUS, POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO, APRESENTANDO SUA CONFORMAÇÃO CARACTERÍSTICA EM <i>ESTRELA DE DAVI</i> . ....	43
FIGURA 11-ÓRGÃOS ALVOS PARA A DOENÇA E PERSISTÊNCIA DO POLIOMAVÍRUS BK E JC. ....	45
FIGURA 12-ESPECTRO DA RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA E A FORMAÇÃO DE DÍMEROS DE TIMINA PELA UV-C. ....	48
FIGURA 13-SÍTIOS DE ALOCAÇÃO DAS OSTRAS NAS DUAS ETAPAS DO TRABALHO: 1-RIBEIRÃO DA ILHA (RIB), 2- SANTO ANTÔNIO DE LISBOA (SAL), 3- TAPERA (TAP) E 4- ESTUÁRIO DO RIO BÜCHELER (BUC). ....	53

FIGURA 14-DEPURADORAS COM UV 36 W, EM FUNCIONAMENTO NOS RESTAURANTES, EM FLORIANÓPOLIS.....	57
FIGURA 15-ESQUEMA DA DEPURADORA BWA SC-2, CONSTRUÍDA PELA BLUE WATER AQUICULTURE LTDA., PARA OS ENSAIOS DE DEPURAÇÃO DESTE ESTUDO.....	58
FIGURA 16-RELAÇÃO ENTRE OS PATÓGENOS HADV E <i>E. COLI</i> (A) E HADV E HU $\nu$ NOV GI (B), EM AMOSTRAS DE OSTRAS E ÁGUA DE CULTIVO DOS 4 LOCAIS ESTUDADOS, EM FLORIANÓPOLIS (RIB, SAL, TAP E BUC), OBTIDA ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR.....	78
FIGURA 17-ANÁLISE FILOGENÉTICA DA <i>GIARDIA DUODENALIS</i> (ASSEMBLÉIA A) DETECTADA NAS ÁGUAS DO ESTUÁRIO DO RIO BÜCHELER.....	79
FIGURA 18-QUANTIFICAÇÕES, POR (RT) QPCR, DOS GENOMAS VIRAIS BIOACUMULADOS PELAS OSTRAS ALOCADAS NOS 4 LOCAIS ESTUDADOS:RIBEIRÃO DA ILHA (RIB), SANTO ANTÔNIO DE LISBOA (SAL), TAPERA (TAP) E ESTUÁRIO DO RIO BÜCHELER (BUC).....	89
FIGURA 19-CISTO DE <i>GIARDIA</i> spp., MARCADO POR IMUNOFLORESCÊNCIA, ISOLADO DE UMA AMOSTRA DO BUC. ....	90
FIGURA 20-DECAIMENTO DE HADV E MNV-1 (EM OSTRAS VINDAS DE 4 PONTOS DE ALOCAÇÃO), DURANTE DEPURAÇÕES COM UV 36 W, 18W E SEM UV, POR 7 DIAS. ....	93
FIGURA 21-RESULTADOS DAS QUANTIFICAÇÕES DE HADV EM OSTRAS DEPURADAS (DEPURAÇÕES COM UV DE DIFERENTES POTÊNCIAS) POR 7 DIAS, NATURALMENTE CONTAMINADAS POR ESTE VÍRUS, NOS LOCAIS ESTUDADOS. CADA AMOSTRA CONSISTIU EM 12 OSTRAS.....	94
FIGURA 22-CONCENTRAÇÕES DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS ENCONTRADOS NAS OSTRAS), ANTES E APÓS OS ENSAIOS DE DEPURAÇÃO, POR 7 DIAS: T0H (14 DIAS NO AMBIENTE, ANTES DA DEPURAÇÃO), SEM UV E COM UV 36W.....	95
FIGURA 23-SECÇÕES HISTOLÓGICAS DOS TECIDOS DIGESTIVOS DE <i>C. GIGAS</i> , SUBMETIDAS À DEPURAÇÃO POR 7 DIAS. TÉCNICAS DE MARCAÇÃO UTILIZADAS: A-H, VANDERBILT; I-L, HEMATOXILINA; M-P, COOMASSIE BRILHANT BLUE E Q-T, PERIODIC ACID SCHIFF. AMOSTRAS: T0H E T7DIAS (S/UV, 18 E 36 W). ....	97
FIGURA 24-SECÇÕES DE BRÂNKUIAS DE <i>C. GIGAS</i> , SUBMETIDAS À DEPURAÇÃO POR 7 DIAS. TÉCNICAS DE MARCAÇÃO: A-H, VANDERBILT; I-L, HEMATOXILINA; M-P, COOMASSIE BRILHANT	

BLUE; Q-T, PERIODIC ACID SCHIFF. AMOSTRAS: T0H E T7DIAS (S/UV, 18 E 36 W).....	98
-----------------------------------------------------------------------------------	----

## **LISTA DE QUADROS**

QUADRO 1-OS DOZE POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES (POPs) ELEITOS PELA CONVENÇÃO DE ESTOCOLMO E SEUS PRINCIPAIS EFEITOS. ....	31
QUADRO 2-VÍRUS UTILIZADOS NOS ENSAIOS REALIZADOS DURANTE O DOUTORADO .....	34
QUADRO 3-COLETAS DE OSTRAS, ÁGUA DO MAR E SEDIMENTOS MARINHOS, REALIZADAS NOS 4 PONTOS DE ALOCAÇÃO DAS OSTRAS E NO LCMM/UFSC. ....	54
QUADRO 4-COLETAS DE OSTRAS E ANÁLISES REALIZADAS DURANTE OS ENSAIOS DE DEPURAÇÃO DO CAPÍTULO II DA TESE. ....	55
QUADRO 5-INICIADORES E SONDAS UTILIZADOS PARA DETECÇÃO DE HADV2, HAV, JCPyV, HuNoV GI/GII E MNV-1 POR (RT) qPCR, NOS CAPÍTULOS I E II DA TESE. ....	70



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1-QUANTIFICAÇÃO DOS PATÓGENOS HUMANOS NA ÁGUA DO MAR E EM OSTRAS (APÓS ALOCAÇÃO POR 14 DIAS), ORIUNDAS DE 4 LOCAIS ESTUDADOS, NAS BAÍAS DE FLORIANÓPOLIS (RIB, SAL, TAP E BUC) E NO LCMM/UFSC, FORNECEDOR DAS OSTRAS.....	76
TABELA 2-CONCENTRAÇÕES DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS (NG G <sup>-1</sup> PESO SECO), NAS OSTRAS (OST) E SEDIMENTOS MARINHOS (SED), DOS 4 LOCAIS ESTUDADOS E NO LCMM/UFSC. ....	80
TABELA 3-QUANTIDADE MÉDIA CÓPIAS GENÔMICAS (GC) DE HAdV2 E MNV-1 NAS ÁGUAS DE CADA AQUÁRIO, DISPONÍVEIS PARA SEREM BIOACUMULADOS POR 4 DÚZIAS DE OSTRAS, DURANTE 24 H. ....	88
TABELA 4-RESULTADOS ENCONTRADOS DE (OO)CISTOS DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP. E <i>GIARDIA</i> SPP., NAS AMOSTRAS DEPURADAS, APÓS 7 DIAS, DOS 4 LOCAIS ESTUDADOS EM FLORIANÓPOLIS. ....	91

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

BHC ou HCH – Hexaclorociclohexano

BUC – Estuário do Rio Bücheler

CEFAS - Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science

DEPC - Dietilpirocarbonato

DDTs - Dicloro-difenil-tricloroetanos

EU – União Europeia

FAO - *Food and Agriculture Organization* of United Nations

FFU - focus forming unit (unidades formadoras de focos de fluorescência)

GC – Genome copies (cópias genômicas)

HAdV – Adenovírus Humano

HAs – Hidrocarbonetos Alifáticos

HAV – Vírus da Hepatite A

HPAs - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

HuNoV – Norovírus Humano

ICTV - *International Committee on Taxonomy of Virus* (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus)

JCPYV – Poliomavírus, cepa JC

LABs – Alquibenzenos Lineares

LCMM – Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos da UFSC

LVA – Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC

MNV-1 – Norovírus Murino 1

M.t – Milhões de toneladas

MV - Mengovírus

OCs - Organoclorados

ORFs – *open reading frames* (fases abertas de leitura )

PCBs - Bifenilas Policloradas

PEG – Polietileno Glicol

PFU – Plaque Forming Units (unidades formadoras de placas)

POPs - Poluentes Orgânicos Persistentes

RIB – Ribeirão da Ilha

RV – Rotavírus

SAL- Santo Antônio de Lisboa

SAV – Sapovírus

STPs - Substâncias Tóxicas Persistentes

TAP- Tapera

TCID<sub>50</sub> – Dose infectante 50%

TD – Tecido digestivo

TG – Tampão glicina

US/FDA – U. S. Food and Drug Administration

USEPA - *Environmental Protection Agency of United States* (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)  
WHO – World Health Organization

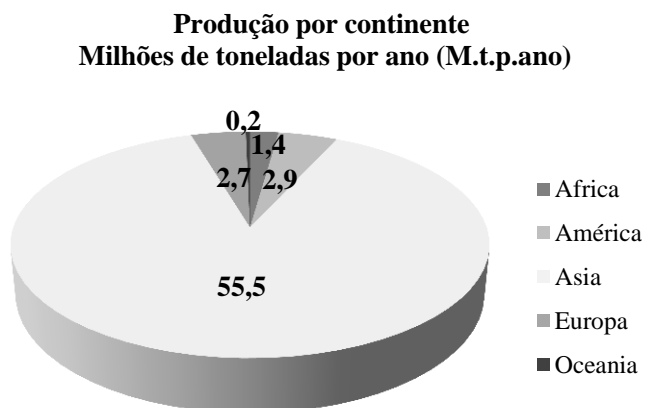


## 1 Revisão Bibliográfica

### 1.1 A expansão do consumo de moluscos no mundo e a relevância do cultivo da ostra do Pacífico em Santa Catarina

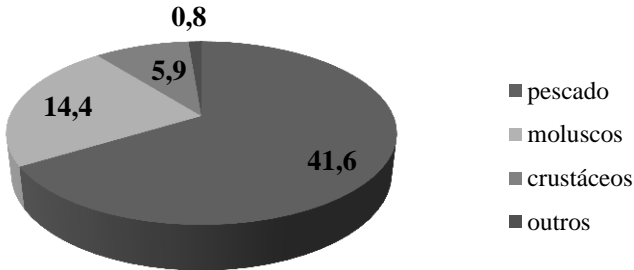
Segundo a *Food and Agriculture Organization* of United Nations (FAO), a produção de peixes comestíveis, através da aquicultura, foi de 62,7 milhões de toneladas (M.t.) em 2011, representando aproximadamente 130 bilhões de dólares; uma contribuição de mais de 40% da produção mundial de peixes. A produção de moluscos ocupou a segunda posição na porcentagem de grupos de espécies produzidas, traduzida em 14,4 milhões de toneladas, em 2011 (Figura 1) (FAO 2013). O cultivo de ostras, principalmente a espécie *Crassostrea gigas*, superou a produção de peixes e crustáceos, no período de 1998 a 2005 em todo mundo, se encontrando distribuído em diversos continentes (LEAL e FRANCO 2008). As ostras *C. gigas* representaram 99,9% (mais de 4 M.t) das ostras mundialmente produzidas, em 2010 (IFREMER 2012).

**Figura 1-Produção mundial de pescado, por continentes e por grupos de espécies (exceto plantas), pela aquicultura, em 2011, segundo a FAO (2013).**



Pescados: peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, répteis

**Volume por grupo de espécies**  
**Produção total de 62,7 (M.t.p.ano)**



**Fonte:** Adaptado de FAO (2013)

No Brasil, o cultivo de ostras e mexilhões é a fração mais importante da malacocultura, sendo mais desenvolvida nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo e Santa Catarina, que é o maior produtor nacional (SANTOS et al. 2013). A malacocultura em Santa Catarina surgiu no final da década de 80 sendo desenvolvida em quase toda a costa catarinense, cerca de 75% da costa, responsável por aproximadamente 85% de toda a produção nacional (SANTOS et al. 2013).

Introduzida no Brasil, Rio de Janeiro, em 1974, a Ostra do Pacífico ou *C. gigas* só começou a ser produzida para fins comerciais na década de 80 em Cananéia, SP. No estado de Santa Catarina, esta prática teve início em 1983, através da Universidade Federal de Santa Catarina (FERREIRA e NETO 2006), sendo atualmente a principal espécie de ostra cultivada no estado. Segundo SANTOS et al. (2013), em 2012, cerca de 660 maricultores cadastrados produziram mais de 23.000 toneladas de moluscos em Santa Catarina, um aumento de mais de 28% quando comparado com a produção de 2011, sendo que destas, 2.400 toneladas foram de ostras. Aproximadamente 80% desta produção está destinada a suprir os mercados de outros estados, através das empresas certificadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF). Florianópolis, o maior produtor de ostras do estado e do país, possui núcleos de produção nas comunidades de Sambaqui, Santo Antônio de Lisboa e Ribeirão da Ilha (SANTOS et al. 2013). Segundo SANTOS et al. (2010), o estado de Santa Catarina é responsável por

mais de 90% da produção nacional de ostras, atividade que rendeu aos cofres do estado de SC mais de R\$ 8.000.000,00 em 2009 e que constitui a única fonte de provimento financeiro para centenas de famílias catarinenses (RUPP et al. 2008).

## ***1.2 O papel da água na veiculação de doenças e o controle sanitário das fazendas de moluscos***

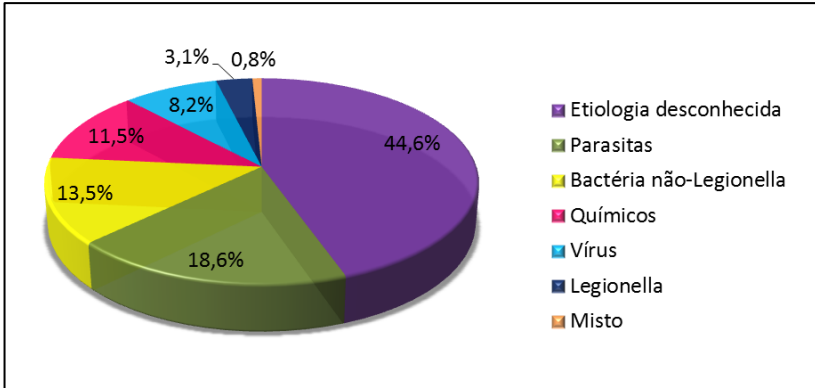
De acordo com pesquisa realizada pelo Sistema Nacional de Informação sobre Saneamento (SNIS) em 2011, somente 55,5% da população brasileira teve acesso à coleta de esgoto e apenas 37,5% do volume coletado era tratado (SNSA 2013). Em entrevista publicada no site G1 Santa Catarina, segundo dados fornecidos pela Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN), somente 12% da população catarinense é atendida com rede de coleta e tratamento de esgoto (COELHO, 2013). Em Florianópolis, principal município produtor de ostras no país, a porcentagem de esgoto coletado é de 100%, mas menos da metade, aproximadamente 40% recebe tratamento (SNSA, 2013).

Os efluentes, que englobam as águas residuais urbanas, domésticas e industriais, podem apresentar constituição bastante variável, como por exemplo, nutrientes (N, P, K), matéria orgânica, metais, organoclorados, derivados do petróleo, patógenos humanos, dentre outros (GARRAFA 2009). Estes resíduos podem contaminar os mananciais, caso não sejam coletados e adequadamente tratados; pois, quando transportados aos ambientes costeiros, colocam em risco de contaminação as áreas de cultivo de moluscos bivalves (SINCERO et al. 2006). Vários fatores podem influenciar nesta contaminação: marés, precipitação pluviométrica, frentes frias e o fluxo de pessoas nas regiões (LENOCH 2003).

A Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, WHO), (2010), descreve uma infinidade de patógenos humanos que podem estar sendo veiculados, até mesmo através da água de consumo, apresentando estes microrganismos diferentes capacidades de permanência neste ambiente, mesmo frente aos meios de desinfecção aplicados nas estações de tratamento de água. Estudo epidemiológico sobre os surtos de doenças ocorridos nos EUA entre 1971 a 2006, provocados pelo consumo ou contato com água (ingestão, inalação, contatos com a pele, mas não durante atividade de

recreação), constatou que grande parte dos agentes causadores destes episódios foram os microrganismos (CRAUN et al. 2010) (Figura 2).

**Figura 2- Porcentagem dos agentes etiológicos em surtos associados à água de consumo.**



**Fonte:** Adaptado de CRAUN et al. (2010).

Vários episódios de contaminação da água de consumo e de moluscos bivalves por patógenos humanos têm sido relatados. Também há relatos de surtos de doenças ocasionados por este tipo de contaminação, principalmente quando os bivalves (especialmente as ostras) são ingeridos *in natura* ou levemente cozidos: HAV por BROMAN et al. (2010), LÓPEZ-GARCIA et al. (2010), PETRIGNANI et al. (2010) e SCHEIFELE et al. (2010); HuNoV por LE GUYADER et al. (2008); FRETZ et al. (2009) e THOMAS et al. (2011); *Cryptosporidium* e *Giardia* por KARANIS et al. (2007), SCHETS et al. (2007) e LEAL et al. (2013); *Salmonella* por ALBARNAZ et al. (2007) e CDC (2011).

### 1.2.1 Legislação e maricultura

Tanto a legislação da União Europeia (EU) quanto dos Estados Unidos da América (EUA), estabelece o monitoramento dos parâmetros bacterianos (*E. coli* ou Coliformes Termotolerantes e Coliformes Totais) no controle sanitário da produção de moluscos bivalves. A EU classifica as áreas de cultivo de moluscos, segundo o



monitoramento de *E. coli* na carne (100g) e no líquido intravalvar do animal. Segundo a quantidade encontrada, as áreas de cultivo são denominadas “A” (liberados diretamente ao consumo), “B” (liberados após procedimentos de purificação, como transposição e depuração, ou cozimento), “C” (liberados após transposição ou cozimento) e Proibidas (não permitido o consumo) (EC 2004b; EC 2004a). Na legislação americana, as áreas de cultivo são classificadas de acordo com a presença dessas bactérias (Coliformes Totais e Termotolerantes) na água de cultivo (100 mL). São denominadas Aprovadas (moluscos diretamente liberados para consumo), equivalentes a áreas A da EU, e Restritas (moluscos liberados após procedimento de transposição ou depuração), equivalente a áreas B da EU. A legislação americana não possui classificação equivalente a áreas C da EU. Também podem ocorrer áreas condicionalmente-aprovadas ou condicionalmente-restritas, de acordo com eventos previsíveis de contaminação, segundo US/FDA (2007-revision, printed March 2009).

A legislação brasileira que regula a produção (BRASIL 2005) e a comercialização (BRASIL 2001) de moluscos bivalves, também se baseia no monitoramento de parâmetros bacterianos: *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva, no molusco *in natura*, não consumido cru (BRASIL, 2001) e Coliforme Termotolerantes e *E. coli*, na água de cultivo (BRASIL, 2005), porém já se sabe que não existe correlação entre a presença de bactérias fecais e outros tipos de microrganismos patogênicos humanos nas águas ou nas ostras (SOUZA et al. 2012). Em maio de 2012, o Ministério da Pesca e Aquicultura, através da Instrução Normativa Interministerial nº 07, instituiu o Programa Nacional de Controle Higiênico- Sanitário de Moluscos Bivalves - PNCMB, com objetivo de estabelecer requisitos mínimos para a inocuidade e qualidade dos moluscos bivalves para consumo humano, inclusive o monitoramento e fiscalização destes requisitos. Segundo o PNCMB, as áreas de retirada de moluscos bivalves deverão ser classificadas de acordo com os parâmetros de biotoxinas produzidas por microalgas e de *E.coli*, ambos medidos na parte comestível do molusco, como: liberada, liberada sob-condição e suspensa. Esta mesma Instrução Normativa, designou a Divisão de Inspeção de Pescado e Derivados – DIPES, subordinada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, a fiscalização do cumprimento de requisitos de inspeção industrial e sanitária pelos

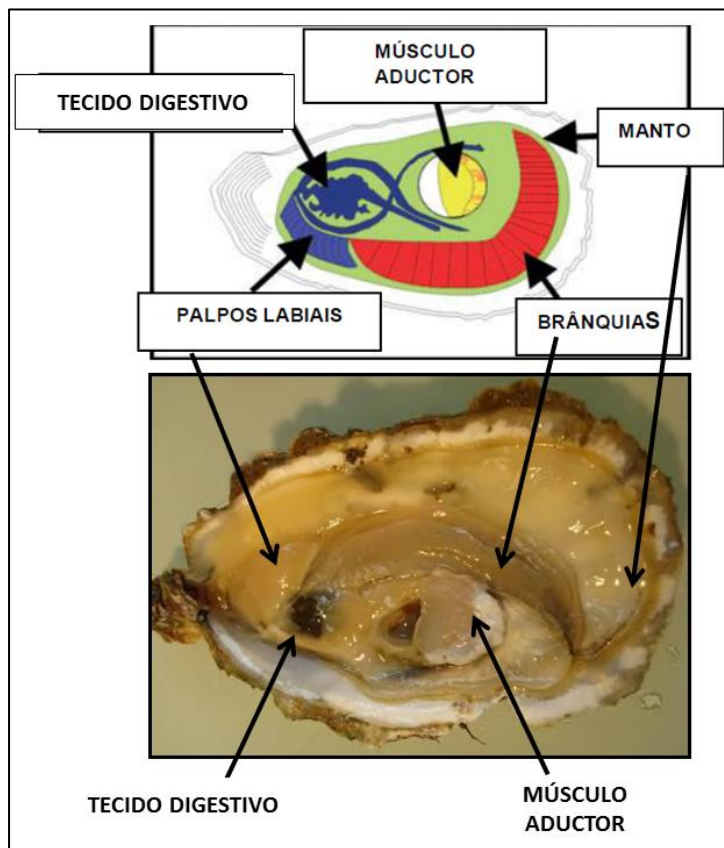
processadores de moluscos bivalves para consumo humano (BRASIL, 2012a). Conforme a Portaria 204/2012, é estabelecida a conduta para a coleta e análises de microrganismos contaminantes e toxinas em moluscos bivalves (BRASIL, 2012b).

Objetivando a proposta de medidas sistemáticas de controle microbiológico dos moluscos bivalves produzidos no estado de Santa Catarina, para que estes se adequem às exigências da União Europeia, em setembro de 2013, a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural (EPAGRI) de SC promoveu um Workshop (Moluscos Bivalves: Medidas de controle microbiológico para atender às exigências da União Europeia) para que se discutissem os principais problemas enfrentados pela maricultura em Santa Catarina. O evento contou com participantes do CEFAS-Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science, laboratório de referência em Saúde Pública do Reino Unido, de integrantes do Governo Federal, de agências reguladoras estaduais, de representantes acadêmicos e do setor produtivo. O Laboratório de Virologia Aplicada/UFSC foi convidado a participar desse Workshop apresentando seus resultados de vários anos de estudos sobre contaminação viral em ostras e em baías oceânicas destinadas a cultivos de moluscos (parte do documento disponível no Anexo A). Este workshop foi publicado no formato de um manuscrito expandido e foi amplamente distribuído pela EPAGRI (SOUZA et al. 2014). Este pode ser um importante passo para o aperfeiçoamento da produção de moluscos bivalves no estado (SOUZA et al. 2014).

### **1.2.2 O processo de bioacumulação de partículas pelas ostras**

Pertencente ao filo Mollusca, classe Bivalva, ordem Ostreoida, família Ostreidae e gênero *Crassostrea*, a ostra possui estrutura física composta por um corpo protegido por duas conchas calcária que se mantém unidas por ligamento tipo dobradiça, em uma das extremidades. O corpo se mantém ligado à concha através do músculo adutor. Possuem grande desenvolvimento das brânquias (Figura 3), que estão envolvidas na respiração e filtração de alimentos (FARIAS 2008). As ostras são organismos bivalves que se alimentam de partículas em suspensão na água.

**Figura 3-Representação esquemática das principais estruturas anatômicas de uma ostra da espécie *Crassostrea gigas*.**

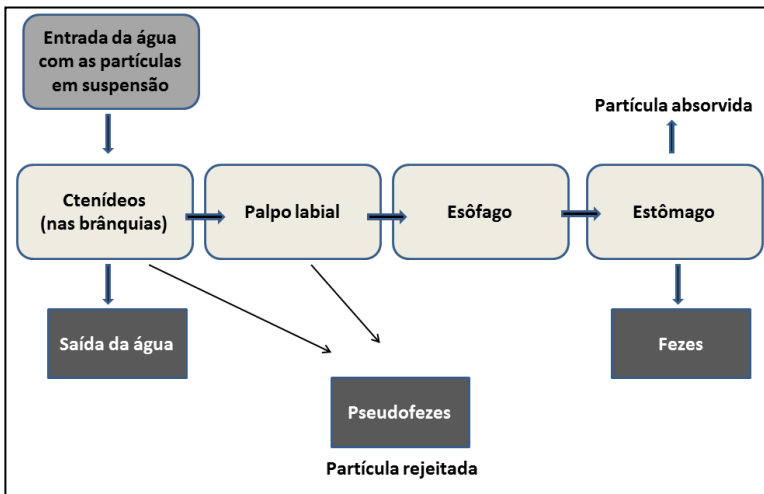


**Fonte:** Adaptado de MCLEOD et al. (2009) e Maalouf, (2010).

Em média, uma única ostra é capaz de filtrar 10 L de água/hora (PEREIRA et al. 2006). O alimento provém de um fluxo de água, que passa através da cavidade do manto, pelas brânquias ciliadas, que são alargadas e pregueadas e funcionam como um filtro, concentrando partículas orgânicas, algas microscópicas e organismos planctônicos que servem de alimento para o animal (PEARSE et al., 1987; WARD, 1996). Vários pesquisadores têm demonstrado que a ingestão de partículas pelas ostras, incluindo patógenos, através do processo de

filtração, obedece a caminhos distintos e que a interação entre a partícula ingerida e o tecido do animal, dependerá do tamanho, da carga e do valor nutricional da partícula (COGNIE et al. 2003; WARD et al. 2003). A maioria dos bivalves é capaz de capturar partículas maiores que 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro com 100% de eficiência e em *C. gigas*, o tamanho máximo é de  $200 \times 150 \mu\text{m}$  (COGNIE et al. 2003; ESPINOSA et al. 2007; MCLEOD et al. 2009). Os caminhos seguidos para este processamento são: retenção das partículas nas brânquias (BARILLÉ et al. 1997), seleção pré-ingestiva nas brânquias e/ou palpos labiais (WARD et al. 1998) e absorção diferenciada no estômago (SHUMWAY et al. 1985), de acordo com as características da partícula ou patógeno, já mencionadas anteriormente (ESPINOSA et al. 2007). Na Figura 4 estão apresentadas as etapas do processamento de uma partícula pelo sistema digestório das ostras.

**Figura 4-Modelo simplificado do processamento de partículas pelas ostras.**



**Fonte:** Adaptado de BEECHAM (2008).

A concentração de partículas, inclusive microrganismos patogênicos ao homem, é muito maior nos tecidos das ostras do que nas águas de cultivo. Estudos revelam que com relação a determinadas partículas virais, a concentração destas partículas na carne do molusco

pode ser até 100 vezes maior do que sua concentração na água de cultivo (BUTT et al. 2004) e, portanto, a ausência de contaminação na água num dado momento, pode não corresponder à ausência de contaminação nos moluscos nela inseridos (LENOCH 2003). Estudos sobre a bioacumulação de partículas virais em moluscos bivalves demonstraram que após 6 h de imersão em água contendo  $8 \times 10^5$  a  $2,5 \times 10^7$  partículas de adenovírus entérico e rotavírus humano por litro, respectivamente, 25 a 35% dos vírus eram adsorvidos pelos tecidos destes bivalves (MUNIAIN-MUJICA et al. 2002). Outros estudos revelam que a eliminação das partículas virais bioacumuladas pelos bivalves nem sempre acontece, mesmo após a depuração destes animais (LOISY et al. 2005; UEKI et al. 2007). Também já foi constatado que mesmo após serem enzimaticamente atacadas, na glândula digestiva da ostra, bactérias podem estar viáveis de 8 a 16 horas após sua ingestão pelo animal, representando ainda um risco de contaminação para os consumidores (BARNABE 1996; MORAES et al. 2000). E que, com o aumento da temperatura da água, como no verão, há aumento das taxas de filtração e crescimento das ostras, acelerando a bioacumulação de partículas (CHRISTO 2006). Por esta característica de animais filtradores, os moluscos bivalves podem ser considerados “bioindicadores” ou “monitores” de contaminação ambiental (SINCERO et al. 2006).

### **1.2.3 Contaminação química e microbiológica das ostras e dos cultivos**

A contaminação marinha pelo esgoto disponibiliza neste ambiente uma grande variedade de substâncias, como nutrientes, metais, compostos orgânicos, patógenos, etc. Estas substâncias podem produzir nos seres vivos presentes no mar, efeitos tóxicos (BOLONG et al. 2009), ocasionando estresse neste ecossistema, através da alteração de estrutura, funções e diversidade, muitas vezes produzindo mutações genéticas e até mesmo a morte dos organismos envolvidos, (LÓPEZ-BAREA e PUEYO 1998). O contato e a metabolização de diversas substâncias e partículas pode acarretar uma gama de reações nos seres vivos que fazem parte deste ambiente marinho, como as ostras, e dos animais que delas se alimentam.

### 1.2.3.1 Compostos orgânicos

O grande aporte dos contaminantes orgânicos no ambiente marinho, dentre outras substâncias, compromete a capacidade metabólica de degradação da matéria orgânica e a regeneração mineral desempenhada por alguns microrganismos. Esses contaminantes orgânicos são denominados Substâncias Tóxicas Persistentes (STPs), possuindo dois importantes grupos: os Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) e os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) (ALMEIDA et al. 2007b). Dentre os POPs, os Organoclorados (OCs), as Bifenilas Policloradas (PCBs), os Diclorodifenil-tricloroetanos (DDTs) e o Hexaclorociclohexano (BHC ou HCH) contaminam diversos ambientes, inclusive o marinho (PEDERZOLLI et al. 2005; MALUF 2009).

Os OCs, por suas características de alta hidrofobicidade, baixa reatividade no ambiente e tendência à bioconcentração nos tecidos dos organismos vivos (ALMEIDA et al. 2007a). Alguns deles, como os DDTs, podem permanecer no solo por centenas de anos (SALDANHA 2006).

O tempo de permanência de alguns dos STPs nos sedimentos, pode ser bastante elevado, sendo este local de grande importância nos estudos sobre impactos da contaminação. Nos HPAs, a permanência está relacionada à sua massa molecular, pois se é baixa pode ser degradado mais rapidamente (em torno de 40 dias); se alta, pode levar anos. Já os PCBs apresentam uma meia-vida, no sedimento, que pode exceder a seis anos (ALMEIDA et al. 2007a).

As STPs podem ser introduzidas no meio ambiente por diversas rotas, como derrames, pulverizações, trocas atmosféricas, etc., acarretando uma diversidade de danos nos seres vivos (QUADRO 1). Os animais marinhos, como os moluscos bivalves, também podem acumular contaminantes inorgânicos e orgânicos nos seus tecidos tornando-se fontes de contaminação para os humanos (MITRA et al. 2011; PEDERZOLLI et al. 2005).

**QUADRO 1-Os doze poluentes orgânicos persistentes (POPs) eleitos pela convenção de Estocolmo e seus principais efeitos.**

SUBSTÂNCIA	EFEITOS CONHECIDOS OU POSSIVELMENTE RELACIONADOS
DDTs	Interferente Endócrino (IE) Cancerígeno (mama) Alterações no SNC
Aldrina, dieldrina e Endrina	Supressão do sistema imunológico Convulsões (exposição aguda) e dano hepático (exposição crônica) Efeitos sobre o comportamento IE
Clordano e heptacloro	Cancerígeno potencial (mama) Danos ao SNC e ao fígado (animais)
Hexaclorobenzeno (HCB)	Cancerígeno potencial (em roedores) Efeitos sobre o DNA de hepatócitos humanos Alteração na função leucocitária (exposição ocupacional) e IE Baixas doses levam à alteração na produção de esteroides pelas células adrenocorticais (em ratos) Porfiria cutânea tardia (exposição aguda) Bócio
Mirex	Carcinogênico (em ratos) Associado à supressão do sistema imunológico Catarata nos fetos Hipertrofia do fígado após exposição prolongada a doses reduzidas
Toxafeno	Cancerígeno IE Distúrbio no desenvolvimento (mamíferos)
Dioxinas e furanos	IE Alteração o sistema imunológico e no desenvolvimento Cancerígeno (dioxina)
PCBs	IE Alterações neurológicas e comportamentais Baixos resultados psicomotores em humanos (exposição na vida fetal)

IE: interferente endócrino; PCBs: bifenilas policlorinadas.

**Fonte:** Extraído de FONTENELE et al. (2010).

### 1.2.3.2 Microrganismos patogênicos humanos

As principais bactérias, de origem fecal, envolvidas na contaminação de moluscos pertencem aos gêneros *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia*. Entretanto, como tais microrganismos são facilmente inativados pelos procedimentos de tratamento de água ou efluentes e também facilmente removidos dos tecidos do molusco durante o processo de filtração (BURRI e VALE 2006), a ausência destes patógenos nos moluscos e locais de cultivo não exclui a presença de protozoários e vírus, sabidamente mais resistentes (ORTEGA et al. 2009). Estudos já comprovaram que a presença de bactérias no ambiente marinho, principalmente os coliformes, é um indicativo de contaminação contínua, ou recente, já que estes microrganismos tornam-se facilmente inviáveis, devido principalmente à salinidade da água (NOBLE et al. 2004; ANDERSON et al. 2005). Por serem parâmetros microbiológicos que necessitam ser monitorados na água de cultivo de moluscos bivalves e no tecido das ostras, segundo as legislações brasileiras (BRASIL, 2001; BRASIL, 2005), as bactérias *E. coli* e *Salmonella* sp. foram incluídas em algumas etapas deste estudo. O gênero *Salmonella* é responsável por grandes surtos mundiais de gastroenterite, especialmente por necessitar de uma baixa dose infecciosa de  $10^2$  UFC/g de carne, dependendo da linhagem bacteriana (CORRÊA et al. 2007). As salmonelas podem estar presentes nas fezes de alguns pássaros, como as gaivotas, aumentando o risco de contaminação das fazendas de cultivo de moluscos bivalves (ALBARNAZ et al. 2007). A *E. coli*, além de gastroenterites e infecções do trato urinário, também podem ocasionar outras doenças em humanos como, meningite e septicemia (DONNEMBERG 2010).

Protozoários, como os pertencentes aos gêneros *Cryptosporidium* e *Giardia*, podem se alojar nos tecidos de ostras cultivadas em águas contaminadas por águas residuais. Diversos trabalhos relataram a presença de (oo)cistos destes patógenos nas águas costeiras em diversos países (GÓMEZ-COUSO et al. 2005; SCHETS et al. 2007; LEAL et al. 2013). O *Cryptosporidium* está relacionado aos episódios de diarreias autolimitadas nos humanos, porém pode acarretar quadros mais graves nos pacientes imunocomprometidos. A *Giardia* está associada às diarreias, principalmente em crianças, podendo ocasionar prejuízo em seu



desenvolvimento físico e cognitivo (LEAL e FRANCO 2008). Por serem os oocistos de *Cryptosporidium* e os cistos de *Giardia* mais resistentes nos ambientes marinhos do que as bactérias e por já terem sido isolados em ostras, oferecendo riscos aos humanos, a pesquisa destes protozoários foi introduzida em algumas etapas deste trabalho doutoral.

O grupo dos vírus entéricos compreende todos os vírus presentes no trato gastrointestinal humano e que, após transmissão por via fecal-oral, pode causar doenças em indivíduos susceptíveis (TAVARES et al. 2005). Por serem não envelopados são extremamente resistentes às situações adversas, muito mais que as bactérias. GABUTTI et al. (2000), constatou que os vírus entéricos podem persistir viáveis na água do mar de 2 a 130 dias, sendo este período muito maior do que o observado para os Coliformes Termotolerantes num ambiente semelhante. Também constatou que os poliovírus e o vírus da hepatite A (HAV), por exemplo, podem estar presentes, neste ambiente, por 671 dias a 4°C e 25 dias a 25°C, respectivamente (SATTAR et al. 2000). Além da maior resistência aos estresses ambientais, os vírus entéricos são capazes de permanecer por mais tempo nos tecidos dos moluscos, especialmente os Norovírus (RICHARDS 2003; CABALLERO et al. 2004; LE GUYADER et al. 2006).

Sendo assim, a contaminação química e microbiológica, relacionada direta e indiretamente à atividade humana e animal, está afetando cada vez mais a qualidade sanitária dos alimentos produzidos nestas águas, bem como o uso recreativo de águas costeiras. As práticas atuais de tratamento de água são incapazes de prover efluentes tratados livres de vírus, como consequência, patógenos virais humanos são rotineiramente introduzidos em águas marinhas e em estuários, representando um risco aos consumidores de moluscos bivalves, principalmente quando consumidos *in natura*, como é o caso das ostras.

Foram objetos deste estudo, os seguintes vírus entéricos: Adenovírus Humanos (HAdV), o Rotavírus Humano (RV), o HAV, dois gêneros da família *Caliciviridae*, os Norovírus GI/GII (NoV) e os Sapovírus (SAV), utilizando-se o Norovírus Murino (MNV-1) como modelo para os vírus com genoma RNA em alguns ensaios; ele é o único genótipo de NoV adaptado ao cultivo celular *in vitro*. Além destes, foi incluído o Poliomavírus cepa JC (JCPyV), por ser um vírus

de veiculação hídrica e causador de doença em humanos. Fizemos parte dos ensaios realizados no LVA-UFSC, descritos nos capítulos I e II os vírus: HAdV, HAV, NoV GI e GII, JCPyV e o MNV-1. Nos ensaios realizados durante o estágio doutoral no IFREMER foram utilizados os vírus: NoV GI, SAV e RV. Algumas características e doenças ocasionadas por estes vírus estão descritos no QUADRO 2.

#### QUADRO 2-Vírus utilizados nos ensaios realizados durante o doutorado

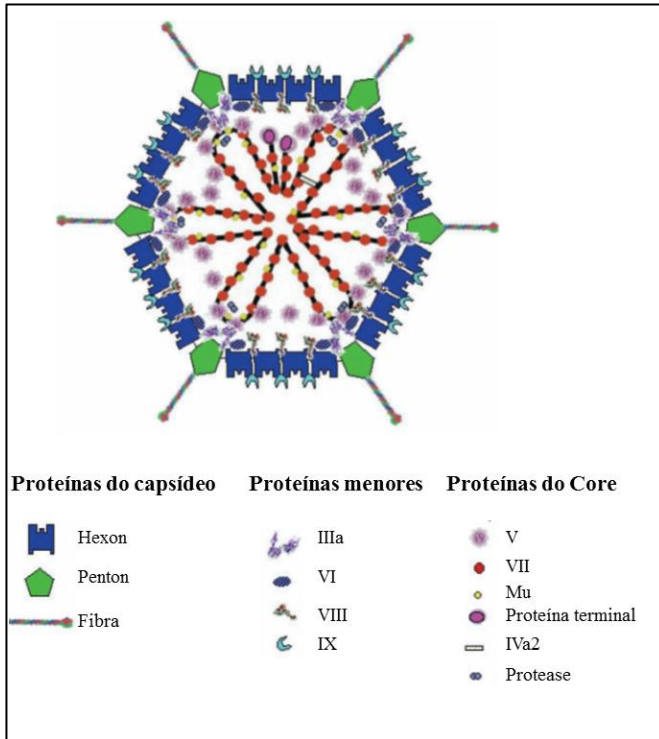
VÍRUS	TAMANHO	GENOMA		DOENÇA OCACIONADA
		Tipo	Tamanho (Kb)	
HAdV	70-100 nm	DNA <sub>df</sub> linear	26-45	Infecções respiratórias, oculares, cistites e gastroenterites.
RV	70-90 nm	RNA <sub>df</sub> composto por 11 segmentos	16,5-21	Gastroenterites
HAV	27-32 nm	RNA <sub>sf</sub> senso +	7,5	Hepatite entérica
NoV GI e GII	27-40 nm	RNA <sub>sf</sub> senso +	7,5-7,7	Gastroenterites
SAV	27-40 nm	RNA <sub>sf</sub> senso +	7,3-8,3	Gastroenterites
JCPyV	40-45 nm	DNA <sub>df</sub> circular	5	Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva
MNV-1	27-40 nm	RNA <sub>sf</sub> senso +	7,4	Gastroenterites em ratos, não causa doenças em humanos.

Fonte: Própria autora

Os HAdV são pertencentes à família *Adenoviridae*, que é dividida em cinco gêneros. O gênero *Mastadenovirus* é responsável por causar infecções em mamíferos, possuindo sete espécies (A-G) que causam doenças em humanos, segundo o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV - *International Committee on Taxonomy of Virus*), (2012). Possuem capsídeo de formato icosaédrico composto de 252 capsômeros, sendo estes 240 *hexons* e 12 *pentons*. Em cada

*penton* há a projeção de uma única fibra, que varia de tamanho de acordo com os sorotipos (Figura 5). A exceção são os sorotipos entéricos, AdV-40 e 41, que possuem duas fibras projetadas em cada *penton*. Estas fibras desempenham importante papel na adsorção dos vírus às células hospedeiras (Mena e GERBA 2008). Os HAdV podem ser transmitidos através da inalação de aerossóis, no contato pessoa-pessoa e via fecal-oral (através da ingestão de água ou alimentos contaminados) causando enfermidades que acometem as vias respiratórias superiores e inferiores provocando faringites, pneumonias, doença respiratória aguda, febres, infecções oculares agudas (como conjuntivites), cistites e gastroenterites (MENA e GERBA 2008). Por suas características estruturais (falta de envelope e DNA dupla fita), esses vírus apresentam uma grande estabilidade, permanecendo viáveis por longos períodos de tempos nos ambientes, sendo resistentes à desinfecção por alguns agentes químicos e físicos, inclusive a extremos de pH (Mena e GERBA 2008; CORRÊA et al. 2012). Estudos constataram que os adenovírus podem ser, até 60 vezes mais resistentes a danos no DNA provocados pela incidência de luz ultravioleta (UV) do que outros vírus que possuem material genético de RNA, como o HAV e o enterovírus, isto porque uma das fitas de DNA não danificadas pela exposição à luz UV pode servir como molde para o reparo da outra fita, usando o aparato celular do hospedeiro para a realização deste reparo, mecanismo denominado por fotorreativação (THURSTON-ENRIQUEZ et al. 2003; SIRIKANCHANA et al. 2008). Por esta razão e por sua alta prevalência no meio ambiente, este vírus foi utilizado como controle positivo viral, vírus DNA, durante os experimentos de depuração realizados neste trabalho.

**Figura 5-Esquema do Adenovírus, evidenciando suas estruturas e proteínas.**

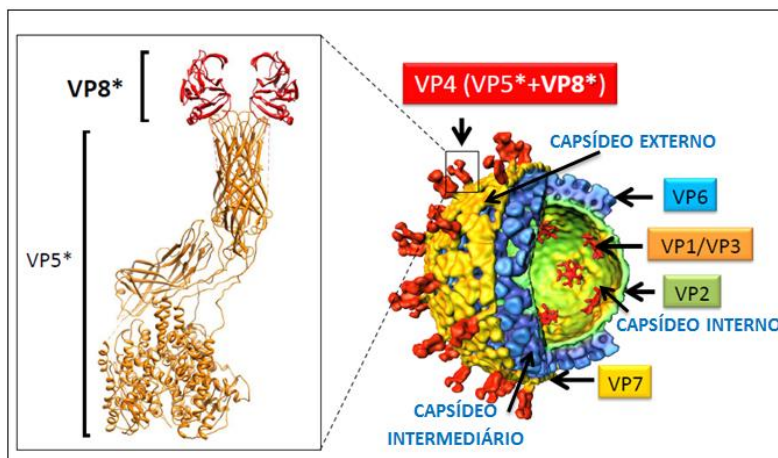


**Fonte:** Adaptado de RUSSEL (2009).

Membro da família *Reoviridae*, o gênero *Rotavírus* é o líder mundial de episódios de desidratação severa ocasionada por diarreia, principalmente em menores de cinco anos de idade, sendo mundialmente responsável por mais de 400.000 mortes, em 2008 (WHO, 2013b). Está classificado em sete espécies, ou grupos (A-G), mas somente os grupos A, B e C causam doenças em humanos (MATTHIJNSSENS et al. 2011). Somente o grupo A é responsável por 1.500 mortes/dia, principalmente em países em desenvolvimento (YENC et al. 2011). O capsídeo viral é composto por três camadas proteicas concêntricas que envolvem o genoma, que constituem em capsídeos externo, intermediário e interno (Figura 6). Seis proteínas

estruturais (VPs) e cinco não estruturais (NSPs) são expressas pelo vírus (MATTHIJNSSENS et al. 2011), elas auxiliam na classificação dos RVs.

**Figura 6-Esquema do Rotavírus, apresentando a localização das proteínas que compõem a partícula viral.**



**Fonte:** Adaptado de PRASAD et al. (2012).

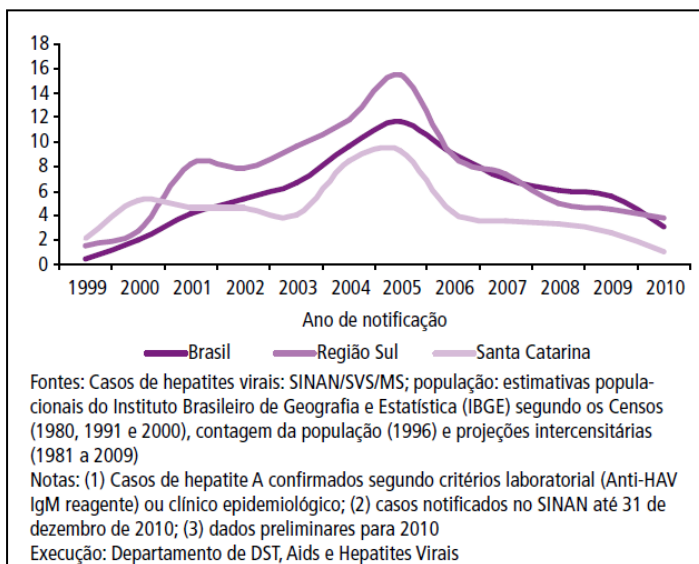
Por sua transmissão fecal-oral, a contaminação da água e de alimentos com os RVs têm desempenhado um papel importante no número expressivo de casos, principalmente nos países em desenvolvimento, lugares que exibem as maiores prevalências desses vírus. Mundialmente, diversos artigos científicos são publicados, reforçando a presença desses vírus contaminando matrizes de água e moluscos bivalves (LOISY et al. 2005; BAGORDO et al. 2013).

Pertencente ao gênero Hepatovirus, família Picornaviridae, o vírus da hepatite A (HAV) está distribuído dentre 6 (I-VI) genótipos conhecidos, porém somente os genótipos de I-III estão associados à doenças em humanos. O genótipo I, subgenótipo A, é mundialmente o mais frequente (cerca de 80%), (BROMAN et al. 2010). O HAV apresenta diferentes níveis de endemicidade e está diretamente relacionado com as condições sanitárias e socioeconômicas das populações. Mundialmente, são aproximadamente 1,4 milhões de casos por ano (WHO 2013a), variando a severidade da doença com a

idade do paciente, crianças jovens são geralmente assintomáticas (BROMAN et al. 2010). Sua transmissão ocorre por via fecal-oral, principalmente através da ingestão de água e alimentos contaminados (TAVARES et al. 2005). Ao ser ingerido, o HAV chega à corrente sanguínea, dissemina-se e infecta as células parenquimais do fígado. Após replicar-se nos hepatócitos e células de Kupfer, é excretado na bile e eliminado nas fezes (GRIFFIN et al., 2003; HOLLINGER e EMERSON, 2007). Normalmente, a doença evolui para cura em até dois meses, mas em alguns casos pode ocasionar uma hepatite fulminante, em menos de 1% dos casos e normalmente em adultos (VITRAL et al. 2006). Os HuNoV e HAV são os principais agentes envolvidos em doenças associadas ao consumo de moluscos bivalves no mundo (MCLEOD et al. 2009), possivelmente por serem capazes de permanecer nos tecidos destes animais por um maior período de tempo (KINGSLEY e RICHARDS 2003; LE GUYADER et al. 2006). Estudo realizado por KINGSLEY e RICHARDS (2003), constatou que o HAV se acumula preferencialmente nas células basais do estômago da ostra *Crassostrea virginica*, podendo permanecer neste local por até 6 semanas. Esta característica dificulta sua remoção durante os processos de depuração.

Entre 1999-2010 foram notificados mais de 130 mil casos de hepatite A no Brasil, sendo a maior parte dos casos registrados nas regiões Nordeste (31,2%) e Norte (22,6%) do país, com cerca de 600 óbitos. Dentre os casos, as crianças menores de 13 anos eram a maioria, constituindo mais de 68% dos casos (MS 2011). Embora haja vacina inativada contra o HAV, ela não se encontra inserida no calendário anual de vacinação, sendo disponibilizada em alguns casos isolados: algumas doenças crônicas, crianças HIV-positivas, pacientes em imunossupressão terapêutica, etc (MS 2011). Em Santa Catarina, nesse mesmo período, 3.062 casos foram notificados (Figura 7), (MS 2011).

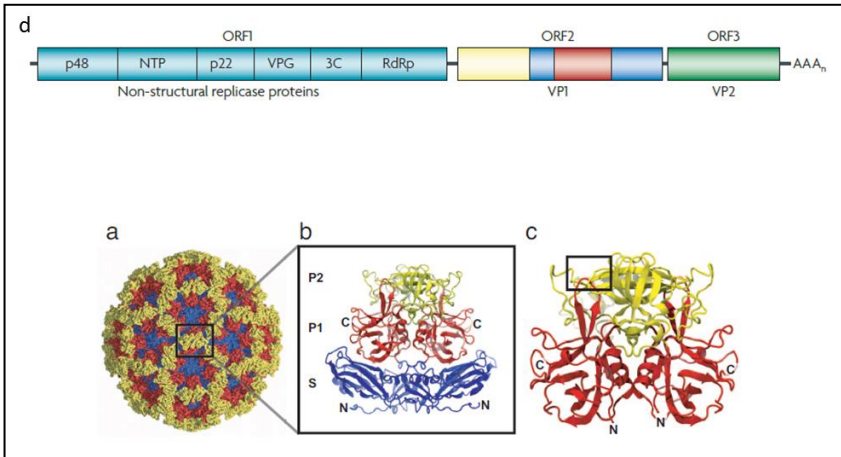
**Figura 7-Taxa de incidência de Hepatite A por 100 mil habitantes, em Santa Catarina, na Região Sul do país e no Brasil, de 1999 a 2010.**



**Fonte:** Extraído de MS (2011).

A família *Caliciviridae* está distribuída em cinco gêneros, mas dois causam doenças em humanos, o Norovírus (NoV) e o Sapovírus (SAV). O gênero *Norovírus* é o principal causador de gastroenterites não bacterianas em todo o mundo, sendo estimados 23 milhões de casos por ano nos Estados Unidos da América (GENTRY et al. 2009), tanto através de água de consumo quanto alimentos contaminados, sendo transmitidos pela via fecal-oral, pessoa a pessoa e por aerossóis (TAVARES et al. 2005). Os NoVs apresentam genoma formado por RNA fita simples de senso positivo, apresentando 3 fases abertas de leitura (ORFs – *open reading frames*). A ORF1 codifica para uma grande poliproteína que é clivada e traduzida em outras seis proteínas importantes, envolvidas na replicação viral, como a polimerase viral (Figura 8). A ORF 2 codifica para a proteína estrutural VP1 e a ORF 3 para a proteína VP2 (ATMAR 2010).

**Figura 8-** (a) Representação esquemática da partícula viral do NoV e da proteína VP1, do capsídeo viral (b), destacando os domínios S, C e P desta proteína; (c) estrutura do domínio P da proteína VP1, com as frações P1, em vermelho, e P2, em amarelo; (d) representação esquemática genoma viral, composto por 3 janelas de leitura.

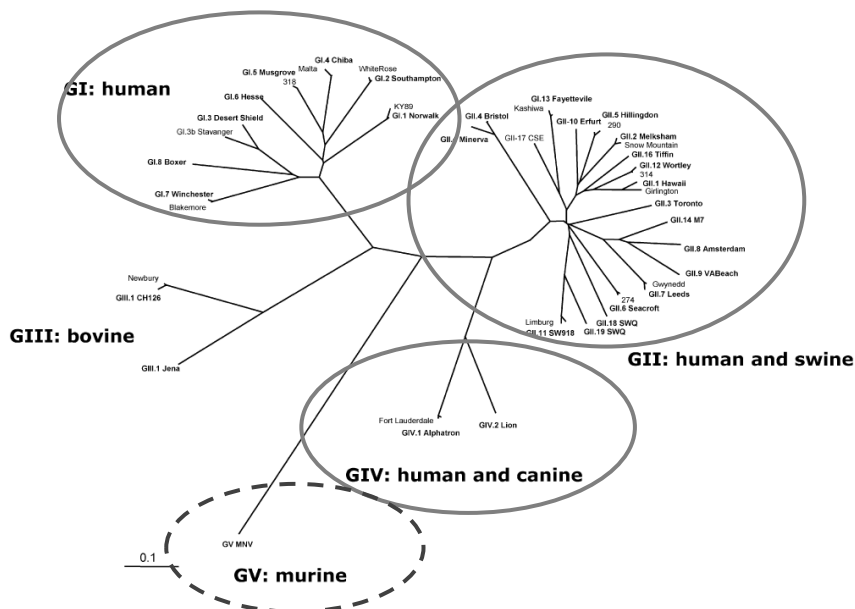


**Fonte:** Adaptado de DONALDSON et al. (2010) e CHOI et al. (2008).

O sequenciamento completo do genoma do capsídeo viral permitiu a classificação dos NoVs em cinco genogrupos (G), os que infectam humanos (GI, II e IV), bovinos (GIII), murino (GV), porcino (GII) e felinos (GVI), (Figura 9). Devido à grande taxa de recombinação durante o processo de replicação e da inexistência de um consenso classificatório dentro da divisão de cada genogrupo, foi proposta por (ZHENG et al. 2006) uma subdivisão abaixo do nível de gênero, onde dentro dos cinco genogrupos foram identificados outros 33 genótipos (9 para o GI; 19 para o GII; 2 para o GIII, 2 para o GIV e um para o GV), baseados nas sequências dos aminoácidos da proteína do capsídeo VP1 (ATMAR 2010).



**Figura 9-Árvore filogenética representando os diferentes genogrupos de Norovírus.**



**Fonte:** Extraído de PATEL et al. (2009).

Dentre os genogrupos de NoVs que infectam humanos, detectados durante surtos de gastroenterites não bacterianas que ocorrem anualmente no mundo, o GII é detectado em mais de 90% das amostras de fezes colhidas dos pacientes, sendo o genótipo 4 o mais frequente, cerca de 70% das detecções realizadas (LE GUYADER et al. 2012). O GI está associado às gastroenterites virais, vinculadas ao consumo de ostras. Isto ocorre pelo fato deste genogrupos se ligar fortemente aos antígenos presentes nas células dos tecidos digestivos das ostras e não se ligar aos receptores presentes nos tecidos mais externos desses animais (como brânquias e manto). O reconhecimento desses receptores celulares é feito por meio da parte mais externa da proteína VP1 (domínio P2), do capsídeo viral Figura 8 (b e c). Estes antígenos são semelhantes aos antígenos presentes em células humanas, constituídos por hidratos de carbono e denominados de antígenos ABH e Lewis. No homem, eles estão presentes em diversas células: como eritrocitárias, vasculares, do

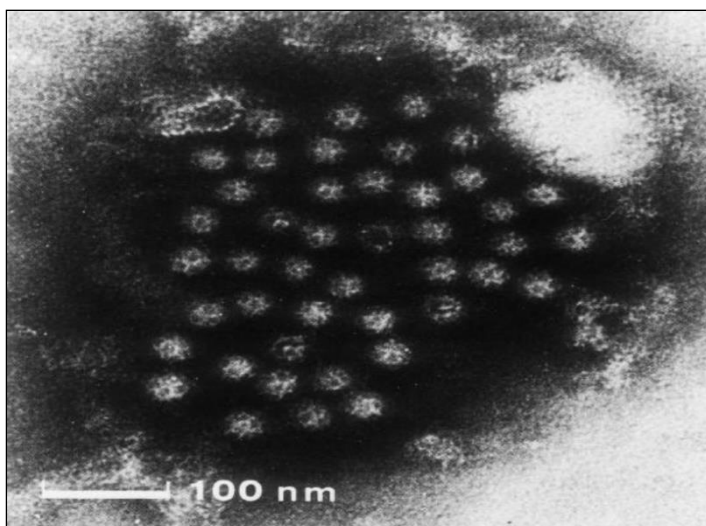
epitélío gastrointestinal, do trato urinário e trato respiratório (MAALOUF et al. 2010b); além de poderem estar presentes em líquidos orgânicos na forma glicolípídica ou glicoproteica (BEIGUELMAN 2003). Uma grande parte das pessoas possui alguns desses antígenos na saliva, na secreção lacrimal, no plasma sanguíneo e no esperma, por isso estes indivíduos são denominados secretores (SHIRATO 2011). LE GUYADER et al. (2006) constatou que por haver similaridade entre estes antígenos e os encontrados em algumas espécies de ostras, os NoVs GI e GII permanecem ligados aos tecidos digestivos destes animais, dificultando que sejam removidos durante os processos de purificação, como a depuração, por exemplo.

Dentre os genótipos existentes, o MNV foi o único que apresentou capacidade de replicação *in vitro* em cultura de células (PATEL et al. 2009). Esta cepa de norovírus está sendo apontada como modelo para inferir as características dos HuNoV (não adaptados ao cultivo *in vitro*) para estudos de estabilidade e quantificação *in vitro*, utilizando-se macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7, permissivos à infecção por estes vírus (BAERT et al. 2008). Do ponto de vista molecular, MNV compartilha muitas características genéticas com HuNoVs, sendo que a análise do genoma de MNV (RNA fita-simples com aproximadamente 7.5 Kb) identificou 3 fases abertas de leitura (ORF) características de NoVs e Versivirus, dois gêneros da família *Caliciviridae*. Em relação à patogenicidade, MNV também compartilha com HuNoVs a capacidade de se dispersar pela via fecal-oral e altas concentrações de partículas virais são encontradas nas fezes do animal infectado (WOBUS et al. 2006).

O segundo gênero da família *Caliciviridae* que é também capaz de ocasionar doenças em humanos, é o SAV (Figura 10). Ele também está relacionado com gastroenterites virais, esporádicas ou epidêmicas, como os NoVs (ANJOS 2013). Estudos já detectaram sua presença em amostras ambientais, inclusive moluscos bivalves, podendo estar associados à gastroenterite viral após consumo de ostras (HANSMAN et al. 2007; SIMA et al. 2011). O gênero SAV possui apenas uma espécie descrita e, segundo o ICTV (2012) está dividida em cinco genogrupos (I-V), porém mais dois genogrupos (VI-VII) são sugeridos pelos pesquisadores, devido às análises filogenéticas (ANJOS 2013). Somente os genogrupos I, II, IV e V infectam humanos (ANJOS 2013). Os genogrupos I, IV e V possuem três fases

abertas de leitura, enquanto o II e o III possuem duas (HANSMAN et al. 2004).

**Figura 10-Sapovírus, por microscopia eletrônica de transmissão, apresentando sua conformação característica em *Estrela de Davi*.**



**Fonte:** Extraído de CHIBA et al. (2000)

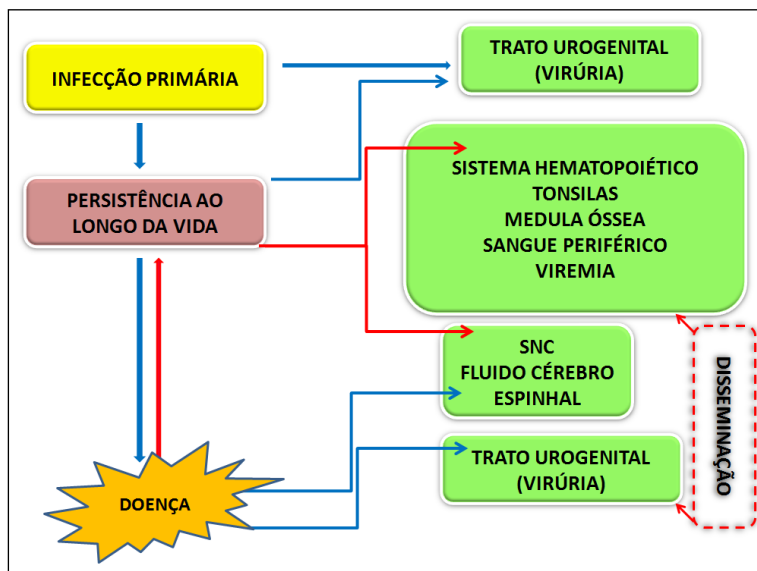
O gênero *Polyomavirus*, da família *Polyomaviridae* possui cinco representantes com potencial patogênico em humanos (KIPyV, WUPyV, MCPyV, JCPyV e BKPyV). O JCPyV e BKPyV apresentam uma alta prevalência na população em geral, com evidência sorológica de exposição prévia em mais de 80% dos adultos (MONTAGNER et al. 2007), tendo aproximadamente 75% de similaridade genômica estes dois vírus. Já os demais poliomavírus humanos foram recentemente descobertos, 2007 e 2008, havendo poucos dados disponíveis sobre eles (DALIANIS et al. 2009). O BKPyV pode ser encontrado nas fezes e urina dos portadores, enquanto que o JCPyV somente na urina (MCQUAIG et al. 2009). Em ambos os vírus (BK e JC), pode ocorrer reativação viral no contexto de imunodeficiências primárias ou adquiridas (Figura 11), como nos pacientes sob imunoterapia, na gravidez, em pacientes idosos ou em portadores de

doenças crônicas, como na diabetes (AHSAN e SHAH 2002; BOOTHUPUR e BRENNAN 2010).

A infecção primária pelo vírus BKPyV, se dá através de infecções respiratórias ou gastrointestinais, que na maioria das vezes são completamente assintomáticas, persistindo indefinidamente como infecções latentes nos órgãos-alvo (Figura 11), (AHSAN e SHAH 2002). Seu sítio preferencial de latência é o tecido renal, estando os pacientes submetidos a transplante renal especialmente vulnerável aos danos de uma potencial reativação viral durante a imunossupressão profilática e terapêutica dos processos de rejeição (MONTAGNER et al. 2007). A reativação desta infecção pode comprometer a função do órgão transplantado por meio do desenvolvimento de estenose uretral e/ou a nefropatia, resultando em disfunção progressiva do rim e perda do enxerto (DOMINGUES et al. 2007; MONTAGNER et al. 2007). Nos pacientes recentemente transplantados de pulmão, ou fígado, ou coração, ou pâncreas, a doença ocasionada por BKPyV é a principal manifestação clínica relatada (MONTAGNER et al. 2007).

JCPyV provoca doença degenerativa fatal produzindo a desmielinização do Sistema Nervoso Central, por meio da doença denominada Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (PML), que se desenvolve em alguns pacientes imunossuprimidos. Ele também tem sido associado ao desenvolvimento de alguns tumores cerebrais (VALLE et al. 2008) e diversas publicações relatam o desenvolvimento da PML em pacientes HIV positivos (CHAN et al. 2008), como também em pacientes com doenças reumatológicas como: o Lupus Eritematoso (MOLLOY and CABRESE 2008), Granulomatose de Wegener (WANG 2004), Artrite reumatoide (NIVED et al. 2008), Dermatômiosite (VULLIEMOZ et al. 2006), dentre outras.

**Figura 11-Órgãos alvos para a doença e persistência do Poliomavírus BK e JC.**



**Fonte:** Adaptado de DOERRIES (2006).

Poliomavírus BK e JC têm sido detectados em amostras ambientais, tais como matrizes de água e ostras, por vários autores (BOFILL-MAS et al. 2000; BOFILL-MAS et al. 2001; ALBINANA-GIMENEZ et al. 2009b; CALGUA et al. 2011; MORESCO et al. 2012; SOUZA et al. 2012). Eles têm se mostrado resistentes em amostras ambientais, uma das razões pelas quais, alguns pesquisadores propuseram que fossem incluídos na Lista de Contaminantes Candidatos (CCL, *Candidate Contaminant List*), proposta pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, *Environmental Protection Agency*) por sua relação com os agentes indicadores, inclusive patógenos humanos, de contaminação ambiental em consequência do processo de urbanização, (ALBINANA-GIMENEZ et al. 2009b; HEWITT et al. 2013); fato este que motivou sua inclusão na investigação realizada nas amostras de ostras e água do mar, em algumas etapas deste trabalho.

#### 1.2.4 Depuração de moluscos bivalves

Apesar de todo o esforço de controle da qualidade da água de cultivo e conseqüentemente dos moluscos, por serem estes organismos filtradores e concentradores de partículas, eles podem se tornar vetores na transmissão dos patógenos humanos anteriormente citados, como de outras partículas nocivas. Pouco se conhece a respeito da dinâmica de depuração dos protozoários e vírus nos moluscos bivalves, nem da cinética dos compostos orgânicos durante a depuração, portanto, maiores estudos nesta área são fundamentais.

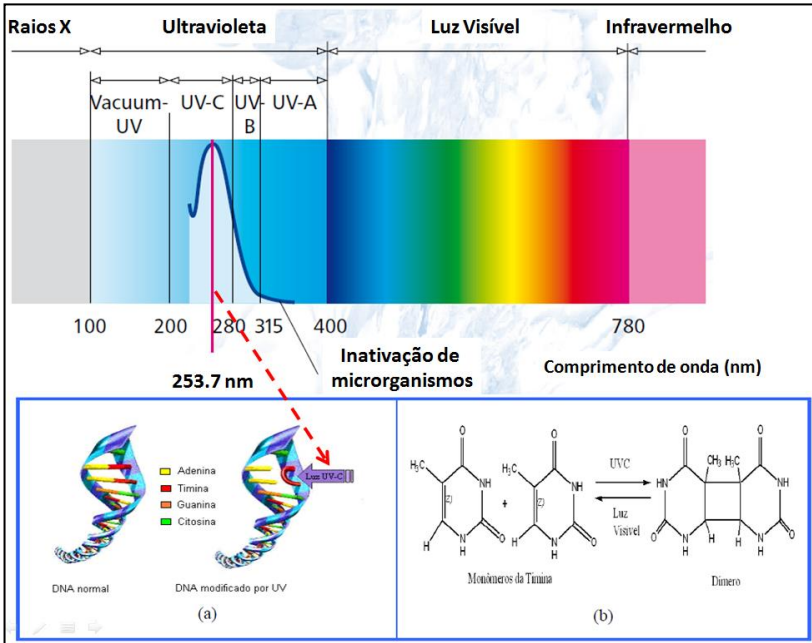
A depuração de moluscos bivalves pode ser realizada em tanques que mimetizam o ambiente natural, nos quais a água marinha (natural ou artificial) limpa é bombeada e estes animais permanecem nestes ambientes monitorados por um determinado tempo para que possam ser descontaminados. Pesquisas sobre depuração de ostras e mexilhões indicaram que ocorre uma eliminação diferencial de patógenos bacterianos com relação aos patógenos virais (POWER e COLLINS 1989). A temperatura da água, a salinidade, o conteúdo de oxigênio dissolvido, a turbidez e a concentração de fitoplâncton podem afetar o processo de eliminação de patógenos (RODRICK 2003). Estudo realizado por SCHWAB et al. (1998), demonstrou que os moluscos quando colocados em tanques de depuração, podem entrar em estado de estresse, ovularem e, com isso, perderem peso e sabor, sendo menos aceitos comercialmente. Com base nesta informação, percebe-se ser imprescindível o estabelecimento de protocolos que reduzam o tempo de depuração para que o estresse seja minimizado.

Depuradoras com sistema fechado circulação de água são as mais utilizadas. Necessitam de uma fonte de água limpa, mas esta água, uma vez coletada, é recirculada pelo sistema, passando por processos de descontaminação durante sua recirculação. (RODRICK 2003). Estes sistemas têm a vantagem de utilizar volumes bem menores de água, podendo até mesmo funcionar com água artificialmente salgada, não limitando seu uso às regiões litorâneas. Além disso, a depuração se apresenta vantajosa por descontaminar a água utilizada, previamente à sua liberação no meio ambiente (CORRÊA 2007). Os principais aspectos a serem considerados na escolha do sistema são o custo de implantação, custo operacional e de manutenção, desempenho (eficiência), efeitos residuais e tempo de

contato necessário (SUPLICY 1998). A descontaminação da água das depuradoras pode ser realizada por meio da cloração, da ozonização ou da luz ultravioleta (UV). A cloração tem sido abandonada por ocasionar desvalorização comercial da carne do molusco e por aumentar o estresse dos animais durante a depuração. A descontaminação por UV tem sido o processo mais aceito (RODRICK 2003), sendo por isso eleito como objeto de estudo neste trabalho.

Radiação UV consiste de toda radiação eletromagnética com comprimento de onda na faixa de 100 a 400 nm (Figura 12), sendo que o comprimento de onda com maior efeito bactericida é o de 253.7 nm (SILVA 2000). O principal mecanismo de ação da radiação UV é a quebra da estrutura de dupla-hélice do DNA pela formação de dímeros de timina. Se a célula absorve uma alta dose de radiação ocorre ruptura de sua membrana celular, causando sua morte. No entanto, para doses menores de radiação, ocorre uma absorção por nucleoproteínas (e nos vírus por algumas proteínas do capsídeo) e ácidos nucleicos (nas células e nos vírus), (USEPA 2006; EISCHEID and LINDEN 2011). Os danos ocasionados aos ácidos nucleicos são cumulativos e são causados pelas alterações fotoquímicas nas suas bases pirimídicas, nas quais são produzidas ligações (covalentes) sucessivas (timina-timina; citosina-citosina; timina-citosina e uracila-uracila) formando dímeros, sendo os dímeros mais comumente formados no DNA os de timina (USEPA 2006). Essa transformação afeta a capacidade de replicação do microrganismo, tornando-o não infeccioso (Figura 12).

**Figura 12-Espectro da radiação eletromagnética e a formação de dímeros de timina pela UV-C.**



**Fonte:** Adaptado de SILVA (2000).

A UV tem se mostrado eficaz tanto para bactérias, quanto para vírus (CORRÊA 2007; CORRÊA. et al. 2012). Entretanto, MURPHREE e TAMPLIN (1991) constataram que o comportamento nas bactérias diferiu quanto ao tempo de exposição aos raios UV. Para *Vibrio cholerae*, *E. coli* e *Salmonella tallahasee*, foram necessárias 3,5, 1,0 e 2,5 horas, respectivamente, de contato entre a água semeada com estas bactérias e a radiação UV, para a eliminação destes patógenos. Diferentes comportamentos frente às doses de UV também já foram observados em alguns vírus (USEPA 2006).

A inativação de microrganismos (K) resulta da intensidade (I) da energia e do tempo (t) de exposição:  $K=I \times t$  (SILVA 2000). Desta forma, também deve ser considerada a wattagem da lâmpada, isto é, a intensidade de UV que ela fornecerá. Quanto maior a wattagem, maior será o nível de proteção (SILVA 2000). A desinfecção por radiação



UV despertou o interesse das empresas de tratamento de águas por ter demonstrado ser efetiva contra oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*, ambos considerados resistentes ao tratamento com cloro (SUNNOTEL et al. 2007). Além disso, diferentemente dos desinfetantes químicos, a radiação UV produz subprodutos de menor toxicidade que os gerados pela cloração.

Vários estudos têm demonstrado que a radiação UV pode inativar efetivamente a maioria dos microrganismos, incluindo agentes patogênicos, como bactérias entéricas, vírus, esporos de bactérias e cistos de protozoários transmitidos através da água (SUNNOTEL et al. 2007), sendo por essa razão, o método de escolha para os sistemas de depuração de moluscos bivalves em muitos países. Outra vantagem sobre os demais métodos de desinfecção de água do mar é o de não alterar as propriedades físico-químicas da água, não interferindo na atividade de filtração dos moluscos (LEE et al. 2008) e de não alterar as propriedades organolépticas do produto, o que acarretaria uma desvalorização comercial dos moluscos. A busca por equipamentos para purificação de moluscos *in natura* que sejam mais eficientes, menos onerosos e de fácil manipulação, principalmente para os pequenos comerciantes, tem sido uma carência do setor. A procura por alternativas que garantam a sanidade e o *tempo de prateleira* destes animais é um fato que agregaria valor ao produto na sua comercialização.

Estudos relatam que a inativação dos microrganismos pela UV está atrelada a dose aplicada e que os vírus, em particular, requerem doses mais altas para sua inativação. Dentre os vírus entéricos, segundo KO et al. (2005), o gênero Adenovírus tem se mostrado o mais resistente à inativação por UV (mais de 200 mJ/cm<sup>2</sup> para o HAdV41), sendo portanto o controle positivo ideal para a realização dos testes de depuração do presente trabalho doutoral.

Estudos que aprofundem a dinâmica dos contaminantes das ostras, durante o processo de depuração e o contato com a radiação UV, podem auxiliar na busca de melhores protocolos de purificação das ostras, buscando maneiras mais eficientes e comercialmente viáveis.

### 1.2.5 Detecção de vírus em amostras de água e em moluscos

Os maiores desafios na investigação viral em matrizes ambientais, como água e tecidos de moluscos, é aumentar a recuperação das partículas virais, reduzir o efeito citotóxico, quando se utiliza a cultura celular e, eliminar inibidores de reações enzimáticas, no caso da utilização de técnicas moleculares. Para isto, recorre-se à combinação de técnicas que promovam a eluição e posteriormente a concentração destas partículas em pequenos volumes (SINCERO et al. 2006). Diversas metodologias podem ser utilizadas na detecção, quantificação e determinação da viabilidade dos vírus entéricos nestas amostras tais como: a (RT) PCR ((Transcrição Reversa) Reação de Cadeia da Polimerase) que detectam o genoma viral; a (RT) qPCR ((RT) PCR Quantitativo ou em Tempo Real), que quantifica os genomas virais; além das técnicas de cultivo celular, como ICC (Integrated Cell Culture) e os Ensaio de Placa de Lise, dentre outras, que podem acessar a viabilidade de algumas espécies de vírus (KAGEYAMA et al. 2003; BAE e SCHWAB 2008; CROMEANS et al. 2008; ALBINANA-GIMENEZ et al. 2009a; RIGOTTO et al. 2010).

As metodologias utilizadas para detecção viral, realizada neste trabalho doutoral, serão descritas conjuntamente no próximo capítulo.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Geral**

Avaliar a aquisição e a eliminação de contaminantes microbiológicos e químicos em tecidos de moluscos bivalves

### **2.2 Específicos**

- Medir a contaminação microbiológica e química em tecidos de ostras, água de cultivo e sedimento marinho de 5 locais na região da Grande Florianópolis-SC.
- Padronizar ensaios de bioacumulação viral, para contaminar experimentalmente ostras de cultivo a serem depuradas, com concentrações conhecidas de HAdV2 e MNV1.
- Realizar a depuração de ostras por 14 dias utilizando ou não U.V. a fim de analisar a dinâmica de eliminação viral nos seus tecidos.
- Monitorar a utilização de depuradoras de moluscos em restaurantes, que comercializassem ostras *in natura*, por um período de 12 meses, a fim de identificar a aceitação e a facilidade no manuseio dos equipamentos, verificando a qualidade virológica das ostras após quatro dias de depuração, com emissão de laudos destas análises.

### 3 Materiais e Métodos

O presente projeto foi dividido em dois capítulos:

(1) análise da contaminação ambiental em pontos das baías de Florianópolis, com análises nos tecidos das ostras, na água e no sedimento marinho, dos sítios de cultivo;

(2) ensaios de cinética da depuração de ostras com diferentes níveis (quantidade e diversidade) de contaminação, utilizando-se lâmpadas UV de duas wattagens diferentes (18 e 36 W) e o monitoramento das depurações de ostras, em pontos de comércio de ostras vivas, utilizando-se os mesmos tanques de depuração com emissão de laudos das análises realizadas.

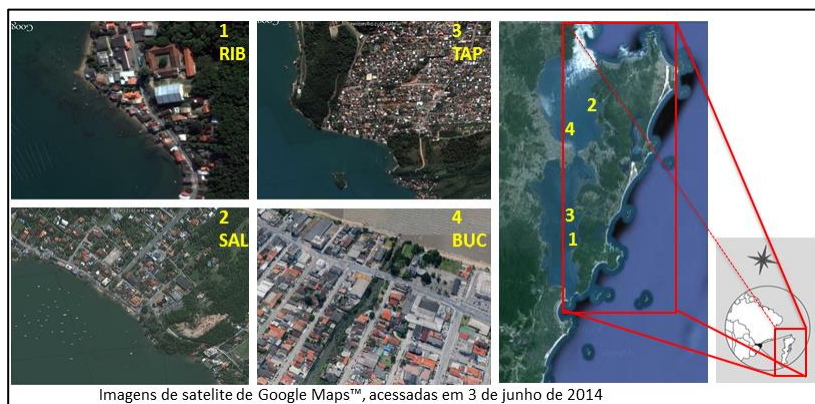
A seguir serão descritos os delineamentos experimentais de cada etapa, bem como as metodologias utilizadas no desenvolvimento das mesmas.

#### 3.1 *Delineamentos Experimentais dos capítulos I e II*

##### 3.1.1 **Capítulo I**

Trinta e três dúzias de ostras *C.gigas* foram divididas em lanternas e alocadas, simultaneamente, em quatro locais das baías sul e norte da Grande Florianópolis-SC, consistindo de dois locais utilizados tradicionalmente para cultivo de moluscos bivalves (RIB-Ribeirão da Ilha e SAL-Santo Antonio de Lisboa) e dois locais impactados pela urbanização, reconhecidamente impróprios para este fim (TAP-Tapera e BUC-Estuário do Rio Bücheler), (Figura 13). Todas as ostras utilizadas nesta etapa do experimento apresentavam idade e tamanhos (em torno de 7 cm) aproximados, tendo sido fornecidas pelo Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos da UFSC (LCMM-UFSC).

**Figura 13-Sítios de alocação das ostras nas duas etapas do trabalho: 1- Ribeirão da Ilha (RIB), 2- Santo Antônio de Lisboa (SAL), 3- Tapera (TAP) e 4- Estuário do rio Bücheler (BUC).**



27° 35' 51.595" S 48° 30' 35.239" W

**Fonte:** Própria autora

Amostras de sedimento, água do mar e de ostras, dos locais envolvidos, antes da distribuição nos sítios de alocação (T0 dia) e após 14 dias de permanência em cada sitio (T14 dias). O T0 de todos os locais (quinto ponto analisado) consistiu nas análises das amostras de sedimento, água do mar e ostras no LCMM-UFSC, no Sambaqui, fornecedor dos animais desta etapa.

Os procedimentos de alocação e retirada das ostras em cada um dos quatro locais ocorreram de forma simultânea, nos mesmos dias (no mês de junho). As quantidades coletadas para as análises das contaminações por bactérias, vírus e protozoários, bem como para as análises compostos orgânicos, realizadas nos tempos T0 e T14 dias são especificados no QUADRO 3. Não foram realizadas análises histológicas nesta etapa.

**QUADRO 3-Coletas de ostras, água do mar e sedimentos marinhos, realizadas nos 4 pontos de alocação das ostras e no LCMM/UFSC.**

PARAMETROS AVALIADOS	AMOSTRAS
<b>MICROBIOLÓGICOS</b>	
<b>Bactérias</b>	
<i>Coliformes Termotolerantes (E. coli)</i>	100 mL da água do cultivo
<i>Salmonella sp.</i>	12 ostras (carne)
<b>Vírus</b>	
HAdV, HAV, NoV GI/GII e JCPyV	10 L da água do cultivo 12 ostras (glândulas digestivas)
<b>Protozoários</b>	
<i>Cryptosporidium</i> (oocistos) e <i>Giardia</i> (cistos)	10 L da água do cultivo 12 ostras (água interna e brânquias)
<b>QUÍMICOS</b>	
<b>Contaminantes orgânicos</b>	
PCBs, pesticidas organoclorados, HAs, HPAs, LABs e esteroides	20 g do sedimento marinho 10 ostras (5g carne)

### 3.1.2 Capítulo II

Os trabalhos descritos no Capítulo II foram divididos em duas etapas: (1) realocação das ostras, nos mesmos locais utilizados no capítulo I (Figura 13) e pelo mesmo período de tempo (T14 dias), para posterior depuração destas ostras, utilizando-se UVs com potências distintas (descrito a seguir). As coletas e análises realizadas nestas ostras estão descritas, no QUADRO 4;

**QUADRO 4-Coletas de ostras e análises realizadas durante os ensaios de depuração do Capítulo II da Tese.**

PARAMETROS AVALIADOS	AMOSTRAS	TEMPOS AVALIADOS
<b>Microbiológicos</b>		
<b>Vírus</b> HAdV, HAV, NoV GI/GII e JCPyV	12 ostras não bioacumuladas artificialmente (glândulas digestivas)	T0 dia= antes da alocação T14 dias=após 14 dias de alocação, antes da depuração. Tempos: 2, 4, 5, 6 e 7 dias de depuração, quando a análise T14 dias detectou o vírus em questão.
HAdV e MNV-1	3 ostras bioacumuladas artificialmente com HAdV2 e MNV-1 (glândulas digestivas)	T4dias das amostras depuradas nos restaurantes. Tempos: T14 dias (antes da depuração), 4 e 7 dias de depuração.
<b>Protozoários</b> <i>Cryptosporidium</i> (oocistos) e <i>Giardia</i> (cistos)	12 ostras (água interna e brânquias)	T0 dia= antes da alocação T14 dias=após 14 dias de alocação, antes da depuração. Após 7 dias de depuração, mesmo sendo os primeiros resultados negativos para os protozoários.
<b>Químicos</b> <b>Contaminantes orgânicos</b> PCBs, pesticidas organoclorados, HAs, HPAs e LABs	10 ostras (5g carne)	T0 dia= antes da alocação T14 dias=após 14 dias de alocação, antes da depuração. Após 7 dias de depuração, sob depurações sem UV e com UV de 36 W.
<b>Histológicos</b>		
<b>Análises histoquímicas e morfológicas</b>	7 ostras	T14 dias=após 14 dias de alocação, antes da depuração. Após 7 dias de depuração.

(2) coletas e análises de ostras depuradas por quatro dias, em quatro estabelecimentos comerciais de ostras vivas, previamente selecionados, utilizando-se as mesmas depuradoras com UV 36W, utilizadas na primeira etapa desse capítulo (Figura 14 e Figura 15). Nesta etapa, foram coletadas 43 amostras (12 ostras cada), ao todo, durante 12 meses. Nas ostras coletadas foi avaliada somente a contaminação viral (HAdV, HAV, NoV GI/GII e JCPyV), com a disponibilização dos laudos destas análises para os comerciantes envolvidos.

As amostras não artificialmente contaminadas com vírus, em que foram detectados HAdVs, foram submetidas aos ensaios de Placa de Lise, com objetivo de acessar a viabilidade destas partículas virais encontradas. Este procedimento foi utilizado tanto para as amostras de tecido de ostras que permaneceram alocadas por 14 dias nos locais estudados (T14 dias), como nas depuradas por quatro dias, nos restaurantes.



**Figura 14-Depuradoras com UV 36 W, em funcionamento nos restaurantes, em Florianópolis.**



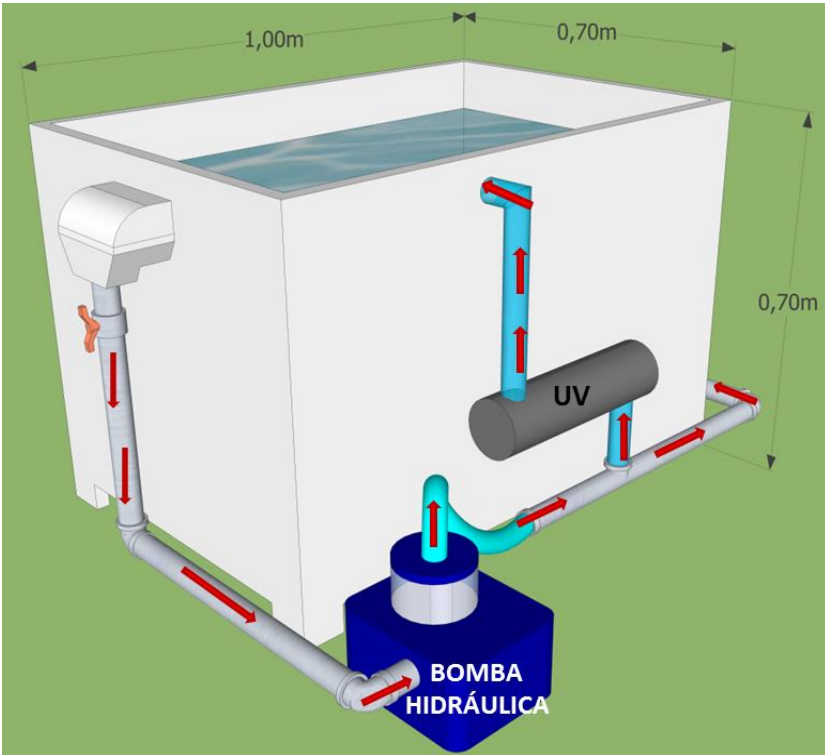
**Restaurantes:** (a) Restinga Recanto Bar e Restaurante e (b) Restaurante e Petiscaria Delícias do Mar, ambos em Sambaqui; (c) Restaurante Rancho Açoriano, no Ribeirão da Ilha e (d) Cantinho das Ostras, em Santo Antônio de Lisboa; Todos na ilha de Florianópolis-SC. **Fotos:** Própria autora.

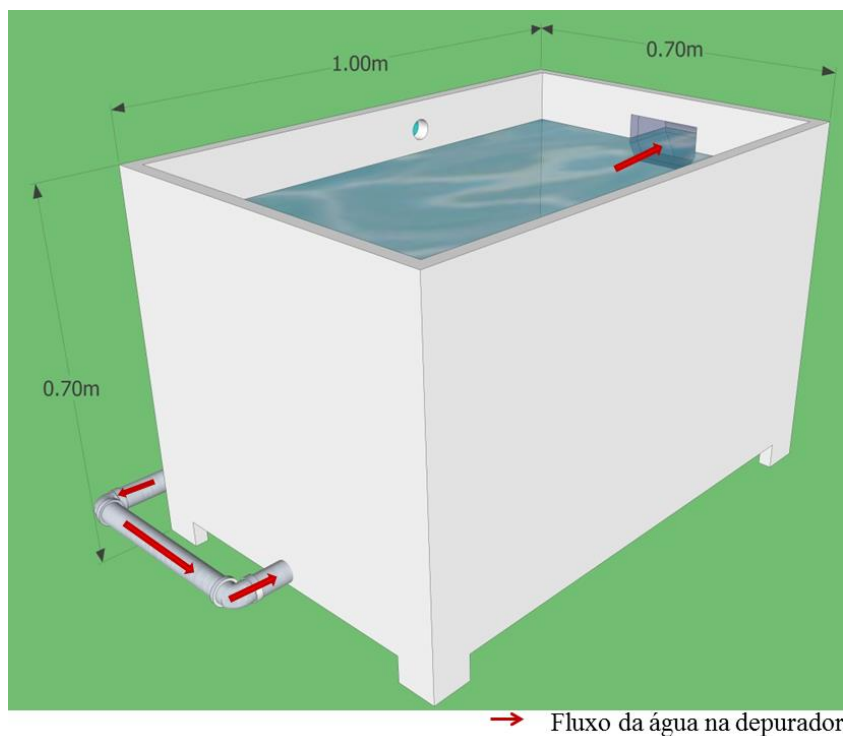
### 3.1.2.1 Depuradoras BWA SC-2

Foram projetadas e construídas 06 depuradoras de moluscos, com sistema fechado de circulação de água, pela empresa *Blue Water Aquaculture Ltda* (modelo BWA SC-2) para que as mesmas fossem utilizadas nos experimentos deste trabalho (Figura 15). Estes sistemas eram constituídos de um tanque plástico com capacidade para 300L de água, uma bomba de recirculação da água e um sistema de radiação UV. As lâmpadas utilizadas eram de 18 ou 36 W (ATMAN II, baixa pressão, luz monocromática 253,7nm), com dose mínima de UV matematicamente estimada (BOULTER e WILSON 1998). As doses eram de  $16 \text{ mJ/cm}^2$ , na potência de 18W, e de  $44 \text{ mJ/cm}^2$ , com 36W, por passagem pela luz UV. Ambos os tanques possuíam um fluxo de

água de 1800 L/h, o que permitia que o volume de 300L de água do mar entrasse em contato com a luz UV 6 vezes/hora. Cada tanque comportava 50 dúzias de ostras, distribuídas em quatro caixas plásticas vazadas, apoiadas em um suporte inferior, projetadas a fim de evitar o contato dos moluscos com as suas excreções.

**Figura 15-Esquema da depuradora BWA SC-2, construída pela Blue Water Aquiculture Ltda., para os ensaios de depuração deste estudo.**





→ Fluxo da água na depurador

**Fonte:** Própria autora

Em uma etapa prévia ao início deste projeto, foram realizados testes de sobrevivência por 15 dias com *C. gigas* nestas depuradoras (com e sem aparato UV), sem o fornecimento de alimento (microalgas). No desenvolvimento deste ensaio foram monitorados os parâmetros de salinidade, pH, temperatura, oxigênio dissolvido, saturação de oxigênio, amônia, amônia não ionizada, sulfetos e nitrito. No início dos experimentos, cada depuradora foi preenchida com água salgada (natural) e povoada com 40 dúzias de ostras, sendo estabelecido como prazo final das depurações o 15º dia do ensaio ou, se antes do término deste período, houvesse uma mortalidade acumulada superior a 50% (VOLPATO 2009).

### 3.1.2.2 Alocação das ostras para depuração

Em momentos distintos (diferentes semanas do ano), 65 dúzias de ostras/ponto, obtidas da Fazenda Marinha Atlântico Sul Ltda, no Ribeirão da Ilha, foram realocadas por 14 dias, em cada um dos 4 pontos onde ocorreram a primeira alocação (Figura 13), para que fossem submetidas a diferentes níveis (quantidade e diversidade) de contaminantes orgânicos (substâncias e microrganismos). As alocações ocorreram nos meses de agosto e setembro/2010 (SAL e RIB); agosto e novembro/2011 (TAP e BUC). O sistema de alocação obedeceu ao já descrito anteriormente, sendo que nesta etapa somente as ostras foram coletadas e analisadas.

Finalizados os 14 dias de alocação das ostras, estas foram retiradas de cada local, foram realizadas coletas nas ostras, para investigação dos vírus e protozoários, de contaminantes orgânicos e avaliação de alterações histológicas (QUADRO 4).

Antes de serem submetidas às depurações, uma parte destas ostras, retiradas de cada um dos locais estudados, foi contaminada artificialmente com HAdV2 e MNV-1, item 3.1.2.3, para que funcionassem como controles positivos virais durante as depurações. A resposta viral (cópias genômicas e unidades formadoras de placa) às doses de UV aplicadas durante as depurações foram calculadas utilizando a equação:  $\text{Log de inativação} = Nt/N0$ , onde N é a concentração viral após a exposição à UV e N0 é o valor obtido antes do tratamento com UV (USEPA 2006).

A temperatura ambiente do laboratório onde foram realizados todos os ensaios de depuração foi de  $20 \pm 2$  °C.

A água do mar utilizada nas depurações das ostras, alocadas nos quatro sítios estudados, foi fornecida pelo LCMM-UFSC (situado na Barra da Lagoa, em Florianópolis). A água era filtrada em filtro de areia e mantida em caixa de água alocada no Centro de Ciências Biológicas da UFSC.

### 3.1.2.3 Bioacumulação de ostras com HAdV2 e MNV-1

Previamente aos ensaios de contaminação artificial das quatro dúzias de ostras por ponto com vírus (controles-positivos para as depurações), foi realizado um ensaio piloto de bioacumulação com o

objetivo de se selecionar o melhor tempo de contato entre os vírus e os bivalves. Para isso, quatro dúzias de ostras *C. gigas* foram colocadas em dois aquários (20 L), com aeração constante, e deixadas em aclimação por 16 h. Duas amostras com 3 ostras cada, foram coletadas (T0 h) e após a coleta, 3 mL de uma suspensão viral contendo HAdV2 e MNV-1 ( $3,0 \times 10^8$  FFU ou PFU de HAdV2 e MNV-1, respectivamente) foram introduzidas em cada um dos aquários. As ostras permaneceram em processo de bioacumulação viral por 24h, em laboratório climatizado (20°C) e amostras (3 ostras/amostra), de cada aquário, foram coletadas nos tempos 3, 5, 8 e 24h após o acréscimo dos vírus. Selecionado o tempo de contato de 3 h, o mesmo protocolo foi repetido para a bioacumulação viral de cada local de alocação. As ostras alocadas em RIB, TAP e BUC foram bioacumuladas com os dois vírus-modelo; as alocadas em SAL foram bioacumuladas somente com o HAdV2, sendo este o primeiro local trabalhado no projeto. Após estes primeiros testes com as ostras de SAL, se decidiu incluir um vírus de genoma RNA (MNV-1), facilmente cultivável *in vitro*, nas bioacumulações posteriores, para que se pudesse observar se haveriam variações nos decaimentos de cópias genômicas entre as duas espécies utilizadas.

Transcorridas as bioacumulações virais, todos os animais (artificialmente e os naturalmente contaminados) foram igualmente distribuídos dentre as seis depuradoras para o início dos testes de depuração, com duração de sete dias. Nos ensaios de depuração de cada um dos pontos estudados foram aplicados três protocolos diferentes de depuração: sem UV (controle), com lâmpada de 18 W e com lâmpada de 36 W (duas depuradoras por tratamento, totalizando 6 depuradoras por ensaio). Todos os ensaios de depuração foram conduzidos em laboratório climatizado à 20°C.

Para análises virais, tanto os animais naturalmente contaminados como os bioacumulados em aquário foram analisados. Dos animais naturalmente contaminados (12 ostras/tempo) foram analisados nos tempos: 0, 2, 4, 5, 6 e 7 dias de depuração, já nos animais artificialmente contaminados (3 ostras/tempo) com os dois vírus-modelo foram analisados nos tempos: TF<sub>B</sub> (final da bioacumulação, antes da depuração), 4 e 7 dias. Nas ostras artificialmente contaminadas só foram realizadas as análises virais, todas as demais análises ocorreram nas ostras não bioacumuladas (QUADRO 4).

Para avaliação da contaminação pelos protozoários, *Cryptosporidium* e *Giardia*, foram coletadas ostras em dois tempos distintos, antes da depuração e após 7 dias (12 ostras/amostra). As coletas para as análises microbiológicas (vírus e protozoários) e alterações histológicas ocorreram nas depuradoras submetidas aos 3 protocolos (s/UV, 18 e 36 W).

A investigação de contaminantes orgânicos foi realizada nas ostras coletadas antes e após 7 dias de depuração, nas depuradoras sem UV e com lâmpada de 36 W. As quantidades coletadas obedeceram ao descrito no QUADRO 4.

#### **3.1.2.4 Depurações de ostras nos restaurantes**

Nas depurações realizadas nos quatro pontos de venda de ostras vivas em Florianópolis (Restinga Recanto Bar e Restaurante e Restaurante e Petiscaria Delícias do Mar, ambos em Sambaqui; Cantinho das Ostras, em Santo Antônio de Lisboa; e no Restaurante Rancho Açoriano, no Ribeirão da Ilha), as águas utilizadas nas depuradoras foram providas pelos próprios comerciantes e coletadas nas proximidades dos seus pontos comerciais, com o auxílio de bombas hidráulicas. Uma vez colocadas nas depuradoras, essas águas só eram renovadas após 4 dias de depuração. As ostras coletadas eram provenientes dos cultivos dos próprios comerciantes, ou adquiridas de fazendas de moluscos nas proximidades destes estabelecimentos comerciais. As ostras foram levadas vivas ao LVA pelos próprios comerciantes, logo após serem retiradas da depuradora.

### **3.2 Produção dos estoques virais**

Previamente aos experimentos realizados nas duas etapas abordadas neste trabalho, estoques virais foram produzidos para que servissem como controles-positivos nos experimentos.

Os controles virais utilizados nos ensaios de bioacumulação viral e os controles positivos virais nas metodologias moleculares e de cultura celular, (RT) qPCR e Placa de Lise, respectivamente, foram realizados de acordo com protocolos já estabelecidos no LVA, descritos a seguir:

Foram utilizadas as cepas HAdV2 (de adenovírus humano), cepa HM 175 (do HAV) e a cepa JC (do poliomavírus humano), nas etapas descritas nos capítulos I e II da tese, como controles-positivos das reações de (RT) qPCRs e Placa de Lise (somente o HAdV2). MNV-1 (de norovírus) também foi utilizado no capítulo II, juntamente com o HAdV2, para os processos de contaminação artificial das ostras. Para a produção *in vitro* das cepas virais citadas, foram utilizadas as seguintes linhagens celulares: A-549 (fibroblastos de pulmão humano, para adenovírus), FRHK-4 (células fetais de rim de macaco Rhesus para vírus da hepatite A), SVG-A (células de glia humana, para o poliomavírus JC) e RAW 264-7 (macrófagos murinos, provenientes de camundongos Balb-c, para os norovírus murinos).

Para o cultivo das linhagens celulares e preparo das suspensões-estoque virais, as células A-549, FRHK-4 e SVG-A foram cultivadas e mantidas em garrafas de 75cm<sup>2</sup>, contendo Meio Mínimo Essencial com sais de Eagle's (MEM, Sigma), suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de PSA, antibióticos/antifúngico (Cultilab-penicilina G 100U/mL/sulfato de estreptomicina 100g/mL/anfotericina B 0,25g/mL). Já as células RAW 264.7 foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium), contendo alta concentração de glicose (4,500 mg/L D-glicose), suplementado com 10% SFB, L-glutamina 2mM a 1% (Sigma, Aldrich Chemie, GMBH, Steinheim, Germany), 1,5% de Hepes (Sigma) e aminoácidos não essenciais (1X) (Sigma). Todas as células cultivadas foram mantidas em estufa a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Quando as quatro linhagens celulares atingiram monocamadas confluentes, foram lavadas 2 vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2, e inoculadas com 1 mL da suspensão do seu respectivo vírus. As garrafas foram incubadas por 1 h a 37°C, em atmosfera de CO<sub>2</sub> a fim de propiciar a adsorção das partículas virais às células. Após este período, os inóculos de cada garrafa foram aspirados e substituídos por meio de cultura (MEM ou DMEM), conforme composição descrita anteriormente, sendo que a concentração final do SFB foi de 2% e incubadas a 37°C, em atmosfera de CO<sub>2</sub>, segundo o tempo de replicação dos vírus inoculados, sendo de 72 h para o HAdV2, sete dias para o HAV e oito dias para o JCPyV. Estes dois últimos vírus tiveram seu meio de manutenção substituído na metade do período de incubação, a fim de

proporcionar um suprimento de nutrientes às células infectadas. Após visualização do efeito citopático (ECP), as culturas sofreram 3 ciclos de congelamento/descongelamento (a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) para que houvesse o rompimento das células e liberação das partículas virais. As suspensões virais foram transferidas para tubos de 50 mL e centrifugada a  $350 \times g$  por 20 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ , para remoção dos restos celulares. Os fluidos virais foram titulados, segundo protocolos já utilizados no LVA (descritos a seguir) e alíquotados para posterior armazenamento à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

O título infeccioso dos estoques virais de HAdV2, HAV, JCPyV produzidos neste trabalho, foram determinados através do método de imunofluorescência indireta, segundo descrito por BARARDI et al. (1998), utilizando-se anticorpos monoclonais específicos para cada um dos vírus em questão. Para isso, utilizou-se um cultivo celular de 24h (densidade de  $3,0 \times 10^5$  células/mL), da célula permissiva ao vírus envolvido, em câmaras de 8 poços (Lab Tek, NUNC), com meio de crescimento (suplementado com 10% de SFB). O fluido viral seriadamente diluído, de  $10^{-3}$  a  $10^{-9}$  em MEM de inoculado em duplicata. Poços (dois) não inoculados com vírus foram utilizados como controles negativos (controles celulares). Após a incubação (1 h), para a adsorção viral às células (à  $37^{\circ}\text{C}$  e  $\text{CO}_2$ , em agitação constante) o inóculo foi removido e adicionado 500  $\mu\text{L}$  de MEM com 2% de SFB por poço. O tempo de incubação para a replicação viral ocorreu de acordo com o ciclo do vírus envolvido. O meio foi removido, as células foram lavadas duas vezes com solução salina fosfato (PBS- *phosphate buffer saline*, pH 7.4) e fixadas 2X com metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 5 min. Após a reidratação das células com 300  $\mu\text{L}$  de PBS à TA por 5 min., o PBS foi removido e adicionado 300  $\mu\text{L}$  de uma solução bloqueadora [PBS, soroalbumina bovina a 1%, (GibcoBRL) e Tween-20 a 0,05%, (Bio-Rad)] com o objetivo de inibir reações inespecíficas durante a incubação com os anticorpos (30min,  $20^{\circ}\text{C}$ , sob agitação). Transcorrida a incubação, se adicionou os anticorpos monoclonais diluídos em solução bloqueadora, de acordo com o vírus envolvido, para a visualização da infecção celular. Foram utilizados os anticorpos monoclonais MAb8052 (Nihon Millipore<sup>TM</sup>®, Tokyo, Japan) na diluição 1:200 para o HAdV2, MON anti-SV40/JC VP41, diluído 1:10, para o JCPyV (gentilmente cedido pela Dra. Rosina Girones da Universidade de Barcelona) e MAB 8241 (Chemicon International Inc.) diluído 1:100 para o HAV. Adicionou-



se a cada poço das células fixadas 100  $\mu\text{L}$  destes anticorpos e incubados por 1h a 37 °C, em agitação constante. Após a incubação, as células foram lavadas 3X com 300  $\mu\text{L}$  da solução bloqueadora por 5 min, sob agitação, sendo mantidas por 15 min em TA. Uma nova incubação, agora com os anticorpos anti-IgG de camundongo, conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma), diluído 1:100 em solução bloqueadora foi realizada. Durante a incubação a placa foi mantida no escuro e com agitação constante. A seguir, as lâminas foram lavadas 3X com solução bloqueadora, secas à TA e montadas com formalina 5%, NaCl 0,25M, DABCO (1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano), pH 8,6; 2,5%. A análise das lâminas foi realizada em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 40), sendo o título viral determinado através da contagem do número de células fluorescentes na maior diluição viral, sendo expresso em unidades formadoras de focos (FFU/mL).

A titulação viral do HAdV2 e MNV-1, utilizados no capítulo II da tese, foi realizada através dos ensaios de placa de lise, segundo descreveram CROMEANS et al. (2008) e BAE e SCHWAB (2008), respectivamente, em placas de seis cavidades.

Para o HAdV2, estas placas contendo as células A-549 (3 X 10<sup>5</sup> células/mL), foram incubadas por 24 h, a 37°C/5% CO<sub>2</sub>, a fim de permitir o crescimento de uma monocamada celular confluenta. Decorrida a incubação, os poços foram lavados com PBS e inoculados, em duplicata, com 250  $\mu\text{L}$  do fluido viral diluído em meio de manutenção (DMEM com 2% SFB), de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup>. Após 1 h de incubação (nas mesmas condições da anterior, mas sob agitação constante), para a adsorção viral, os inóculos foram removidos e a placa foi incubada novamente, com um meio de incubação, 2,5 mL por poço, composto por: DMEM alta glicose 2X; 10 U/mL de penicilina e 10  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomycin; 26 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM de ácido pirúvico; 4% SFB e 0,6% de Bacto ágar (LGCBio). As placas foram incubadas por 7 dias, a 37°C/5%CO<sub>2</sub> e após este período, a camada de ágar foi delicadamente removida. As placas foram coradas, pela adição de 500 $\mu\text{L}$ , por poço, de uma solução de cristal violeta (1:50 em água) e incubadas por 5 min.

Para o acesso da infecciosidade dos HAdV, naturalmente bioacumulados nos sítios de alocação e nas amostras depuradas nos restaurantes, também foram utilizadas as Placas de Lise, conforme descrito anteriormente. Mas além da titulação do HAdV realizado em

cada ensaio de placa, que serviu para controle positivo e balizador da sensibilidade da metodologia, as amostras positivas para este vírus, pela qPCR, após submetidas à eluição viral (item 3.3.1.3) e tratamento por PSA (10 U/mL de penicilina; 10 µg/mL de estreptomicina e 0,025 µg/mL de anfotericina B) foram diluídas e inoculadas nas placas (em triplicata). Os procedimentos realizados nas placas foram semelhantes aos utilizados com a suspensão viral, descritos neste trabalho. Juntamente com as amostras, foram utilizados controles negativos, isto é, uma amostra negativa para HAdV e controle celular, sem inoculação de amostra.

No ensaio de Placas de Lise, para titulação do MNV-1, utilizou-se placas com 6 poços, contendo camadas, com cerca de 80% de confluência, de macrófagos RAW 264.7, na densidade de  $2,0 \times 10^6$  células/mL. As células foram lavadas uma vez com PBS e foram infectadas, em duplicata com 500 µL de diluições entre  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  do fluido de MNV-1, diluído em meio de manutenção (DMEM com 2% SFB). Transcorrida 1 h para a adsorção viral, a 37 °C e CO<sub>2</sub>, o inóculo foi removido e adicionada uma primeira camada (2 mL) de agarose de baixo ponto de fusão (SeaPlaque, Lonza, CA, USA), na concentração final de 1,5%, diluída em meio de manutenção completo 2X concentrado (DMEM), com o objetivo de delimitar os locais onde houve replicação viral e lise celular. Após a solidificação da agarose, as placas foram incubadas a 37 °C/CO<sub>2</sub> durante 48 h, que corresponde ao ciclo de replicação viral, em seguida foi adicionada uma segunda camada dessa mesma agarose (2 mL), preparada segundo o mesmo protocolo descrito anteriormente, mas com a adição de uma solução 0,01% de vermelho neutro (Sigma) para permitir a visualização das placas de lise formadas. Entre um período que variou entre 6 a 8 h, as placas de lise formadas foram contadas sendo estimado o número do título viral, PFU/mL (Unidades Formadoras de Placa/mL), na maior diluição em que elas apareceram.

### 3.3 *Análises Microbiológicas*

Para as análises microbiológicas, depois de checada a viabilidade das ostras que seriam processadas, estas foram lavadas e descontaminadas externamente com álcool 70%, durante 10 min, antes

que fossem abertas para o preparo dos tecidos que seriam utilizados nas análises.

### 3.3.1.1 Bactérias

Nas amostras de água de cultivo (QUADRO 3), coletadas em cada um dos quatro sítios de alocação e no LCMM-UFSC (fornecedor das ostras para a primeira alocação), foram pesquisados Coliformes Termotolerantes (CT), *E. coli*, utilizando a técnica de Número Mais Provável (NMP), em tubos múltiplos. Estas análises foram realizadas pelo Laboratório de Microbiologia da Escola Técnica Federal, em Florianópolis, SC.

Nas amostras de ostras, seguindo o que preconiza a resolução nº 12 da ANVISA/2001, foi investigada a presença da bactéria *Salmonella* sp. em 25 g do homogenato dos tecidos (toda a carne) de 12 ostras (BRASIL, 2001), com o auxílio de um homogeneizador de tecidos Ultra-Turrax (Model T25 basic, IKA Laborotechnik), utilizando-se o Kit comercial Reaveal® Neogen para *Salmonella* segundo às orientações do fabricante.

### 3.3.1.2 Protozoários

As brânquias e as águas internas de uma amostra, constituída por 12 ostras, foram analisadas quanto à presença dos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia*, utilizando-se a técnica de Imunoseparação Magnética (IMS) acoplada à Imunofluorescência Direta (IFA) (SOUZA et al. 2012). Os AN dos cistos de *Giardia* detectados na primeira alocação das ostras por IMS-IFA foram submetidos a PCR e o gene da glutamato desidrogenase sequenciado, segundo protocolos já estabelecidos no Laboratório de Protozoologia/DBA/UNICAMP, pelo doutorando Diego A. Guiguet Leal (SOUZA et al. 2012).

Dez litros de água do mar de cada um dos pontos foram filtrados em membranas de celulose de 47 mm de diâmetro, Millipore® (poro de 3,0 µm) para que fossem pesquisados os dois protozoários-modelo, pelas técnicas de IMS-IFA e PCR (quando detectados cistos de *Giardia*). A IMS-IFA foi utilizada nos capítulos I e II do projeto, já a PCR, com posterior sequenciamento de *Giardia*, somente no capítulo I. As amostras positivas (de água e ostra) para cistos de *Giardia*, pela IMS-

IFA, foram submetidas à extração de ácidos nucleicos (50 µL) para que fossem amplificadas e sequenciadas.

As amostras (ostra e água) foram analisadas conforme protocolos descritos em SOUZA et al. (2012). Estas análises foram realizadas pelo Laboratório de Protozoologia da UNICAMP, parceiro no Projeto MAPA/CNPq.

### 3.3.1.3 Vírus

Em todas as análises virológicas das amostras de água do mar e ostras efetuadas no desenvolvimento deste projeto, foi utilizada a metodologia de amplificação gênica, por meio da técnica de (RT) qPCR. As análises no T0 e T14 dias seguiram a descrição no QUADRO 4, já nas ostras artificialmente bioacumuladas foram pesquisados somente os vírus HAdV (em RIB, SAL, TAP e BUC) e MNV-1 (em RIB, TAP e BUC). Em algumas amostras de ostras processadas nesses dois capítulos (T0, T14 dias das duas alocações e T4 dias dos restaurantes), foram realizadas também, avaliação da infecciosidade do HAdV, nas amostras onde este vírus foi detectado por qPCR.

As amostras de ostras (3 ou 12 animais) foram dissecadas e os TDs destes animais homogeneizados com o auxílio de um homogeneizador de tecidos. Para a recuperação dos vírus presentes nos tecidos das ostras, estas foram submetidas a um processo de eluição viral, segundo o protocolo descrito por LEWIS e METCALF (1988), com algumas modificações, conforme descreveu RIGOTTO et al. (2010), onde 2 g do homogenato de TD foram utilizados. Nas amostras T0 e T14 dias de alocação (dos capítulos I e II) e T4dia dos restaurantes (capítulo II), onde HAdV foi detectado pelo qPCR, foram submetidas aos ensaios de Placa de Lise para este vírus. As amostras submetidas à eluição viral foram utilizadas tanto para extração dos AN e (RT) qPCR, quanto para ensaios de Placa de Lise (nas amostras, conforme descrito anteriormente).

Em cada um dos locais estudados foram coletados 10 L de água do mar, no final do tempo de alocação (T14 dias) e na retirada das ostras do LCMM, antes que fossem distribuídas nos 4 pontos (T0 dia). Cada amostra de 10 L de água foi floculada através do método de floculação orgânica, utilizando leite desnatado acidificado, conforme descreveu CALGUA et al. (2008).

### 3.3.1.4 Extração dos Ácidos Nucléicos (AN) Virais

A extração dos AN das amostras de ostras e águas foi realizada partindo de 200 µL destas amostras processadas, como descrito anteriormente, utilizando-se o QIAamp Minielute Virus kit (Qiagen®), segundo as orientações do fabricante.

### 3.3.1.5 Quantificação das Partículas Virais por (RT) qPCR

Nas reações de qPCR realizadas utilizando sondas de hidrólise, segundo o método Taqman, os plasmídeos utilizados, com as sequências clonadas dos vírus HAdV41(pBR322), HAV (*pGEM®-T Easy Vector*, Promega, Madison, USA) e JCPyV (pBR322), foram doados pela Dra. Rosina Girones (Universitat de Barcelona, Espanha) e de HuNoV GI/GII (utilizando duas sequências, “amplicons”, de cDNA oriundas de RNA molde dos genogrupos GI e GII cada um, clonados separadamente no vetor de clonagem PCR 2.1-TOPO), foram doados pela Dra. Marize P. Miagostovich (FIOCRUZ, RJ-Brasil). Estes plasmídeos foram utilizados como padrões para as amplificações gênicas durante a (RT) qPCR.

Para os (RT) qPCRs do MNV-1, nas ostras artificialmente bioacumuladas, os padrões utilizados foram gerados a partir da junção ORF1/ORF2 do MNV-1, ambos clonados num plasmídeo *pGEM®-T Easy Vector* (Promega), cedido pela Dra Rosina Girones (CORRÊA et al. 2012).

As quantificações dos genomas virais foram realizadas em duplicata, em termociclador *StepOne™ Plus Real Time PCR System* (Applied Biosystems, CA, USA). As sequências dos iniciadores e sondas para cada um dos vírus estudados estão descritos em PAL et al. (2006) (JCPyV), HERNROTH et al. (2002) (HAdV), JOTHIKUMAR et al. (2005) (HAV), KAGEYAMA et al. (2003) (HuNoV) e BAERT et al. (2008) (MNV-1) (QUADRO 5).

**QUADRO 5-Iniciadores e sondas utilizados para detecção de HAdV2, HAV, JCPyV, NoV GI/GII e MNV-1 por (RT) qPCR, nos Capítulos I e II da Tese.**

<b>INICIADORES E SONDAS</b>	<b>SEQUÊNCIAS (5'-3')</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>
<b>JCPyV</b>		PAL et al. (2006)
<b>JE3F</b>	ATGTTTGCCAGTGATGATGAAAA	
<b>JE3R</b>	GGAAAGTCTTTAGGGTCTTCTACCTTT	
<b>JE3P</b>	6-FAM-AGGATCCCAACACTCTAC CCCACCTAAAAAGA-TAMRA	
<b>HAdV</b>		HERNROTH et al. (2002)
<b>ADF</b>	CWTACATGCACATCKCSGG	
<b>ADR</b>	CRCGGGCRAAYTGCACCAG	
<b>ADP1</b>	6-FAM-CCGGGCTCAGGTACTCCGAG GCGTCCT-TAMRA	
<b>HAV</b>		JOTHIKUMAR et al. (2005)
<b>HAV-F</b>	GGTAGGCTACGGGTGAAAC	
<b>HAV-R</b>	GCGGATATTGGTGAGTTGTT	
<b>HAV-P</b>	FAM-CTTAGGCTAATACTTTATGAA GAGATGC-TAMRA	
<b>NoV GI</b>		KAGEYAMA et al. (2003)
<b>COG 1F</b>	CGYTGGATGCGITTYCATGA	
<b>COG 1R</b>	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	
<b>Ring 1A</b>	FAM-AGATYGCGATCYCCTGTCCA- TAMRA	
<b>Ring 1B</b>	FAM-AGATCGCGGTCTCCTGTCCA- TAMRA	
<b>NoV GII</b>		KAGEYAMA et al. (2003)
<b>COG 2F</b>	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	
<b>COG 2R</b>	TCGACGCCATCTTCATTACA	
<b>Ring 2</b>	FAM-TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT- TAMRA	
<b>MNV-1</b>		BAERT et al. (2008)
<b>F-ORF1/ORF2</b>	CACGCCACCGATCTGTCTCTG	
<b>R-ORF1/ORF2</b>	GCGCTGCGCCATCACTC	
<b>MGB-ORF1/ORF2</b>	6-FAM-CGCTTTTGAACAATG-MGBNFQ	

R: purina (A/G); Y: pirimidina (C/T); B: não A; R:A ou G; N:A/CT/G.

Para os vírus com genoma DNA (HAdV e JCPyV), a qPCR ocorreu em uma solução de 25  $\mu\text{L}$  de volume final (sendo deste 10  $\mu\text{L}$  da amostra), contendo 12,5  $\mu\text{L}$  de TaqMan Universal PCR Master Mix, 2X concentrada (Applied Biosystems), mistura essa que contém os reativos necessários para a reação de PCR, como a enzima Taq DNA Polimerase, oligonucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) além das condições salinas adequadas. Para o HAdV foram acrescentados à solução de reação da qPCR os iniciadores ADF e ADR na concentração final de 0,9  $\mu\text{M}$  e sonda de hidrólise, TaqMan, ADP1 na concentração final de 0,225  $\mu\text{M}$ . Para a reação de qPCR realizada para o JCPyV, foram adicionados os iniciadores JE3F e JE3R na concentração final de 1,0  $\mu\text{M}$  e sonda de hidrólise, TaqMan, JE3P na concentração final de 0,6  $\mu\text{M}$ . As sequências dos iniciadores e sondas que foram utilizadas encontram-se descritos no QUADRO 5. O protocolo de temperaturas e tempos utilizado nas qPCR dos dois vírus foi de 2 min a 50  $^{\circ}\text{C}$ , seguido de 10 min a 95  $^{\circ}\text{C}$  para ativação e inativação respectivamente da enzima UDG que serve como um controle de contaminação por DNA previamente presente na amostra antes da amplificação, seguido por 45 ciclos de desnaturação a 95  $^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos e anelamento dos iniciadores/sonda (e extensão) ambos a 60  $^{\circ}\text{C}$  por 1 min.

Para os vírus com genoma RNA (HAV, NoV GI/GII e MNV-1), foram utilizados os seguintes protocolos:

Nas reações de RT qPCR para o HAV e MNV-1 utilizou-se o Kit comercial QuantiTect Probe RT-PCR (QIAGEN), contendo os reativos: HotStartTaq DNA Polimerase, oligonucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), enzima transcriptase reversa (RT), necessária para que ocorra a transcrição do RNA da amostras para cDNA, além das condições salinas adequadas. Com a utilização deste kit foi possível realizar a RT qPCR em um único passo.

Para ambos os vírus, o volume inicial da mistura dos reativos do kit (2X concentrado) foi de 12,5  $\mu\text{L}$ , acrescentando os iniciadores e sondas, de acordo com o vírus investigado. Para o HAV, utilizou-se os iniciadores HAV-F e HAV-R na concentração final de 0,25  $\mu\text{M}$  e a sonda de hidrólise, TaqMan, HAVP na concentração final de 0,15  $\mu\text{M}$ , num volume final de 15  $\mu\text{L}$ , sendo que após a adição da amostra (10  $\mu\text{L}$ ), o volume final da reação foi de 25  $\mu\text{L}$ . Para o MNV-1 foram utilizados os iniciadores MNV-F e MNV-R na concentração final de 0,2  $\mu\text{M}$  e sonda TaqMan MNVP na concentração final de 0,2  $\mu\text{M}$  e após adição da amostra de RNA (5  $\mu\text{L}$ ), num volume final de 25  $\mu\text{L}$ .

O protocolo de temperaturas e tempos utilizado na reação de RT qPCR para o HAV foi inicialmente de 50 °C por 30 min, para a realização da RT, seguido por desnaturação a 95 °C por 15 min e amplificação em 45 ciclos de 95 °C por 10 s (desnaturação), 55 °C por 20 s (anelamento) e extensão a 72 °C por 15 s. Para o MNV-1, além da temperatura inicial de 50° por 30 min para a reação de RT, seguido de desnaturação a 95 °C por 10 min e 40 ciclos de amplificação iniciando a 95 °C por 15 s para desnaturação e 60 °C por 1 min para anelamento e extensão.

Previamente à reação de qPCR para o HuNoV, foi realizada uma reação transcrição reversa (RT) para a síntese do DNA complementar (cDNA), utilizando-se iniciadores randômicos. Para isso, utilizou-se 5 µL do RNA purificado, em uma reação de volume final de 25 µL, o RNA foi primeiramente desnaturado a 97 °C por 5 min e resfriado por 2 min em gelo e depois adicionado à mistura da reação contendo 20 pmol de iniciador randômico (Promega), 0,6 mM de dATP, dCTP, dTTP e dGTP; 100 U/L de da enzima transcriptase reversa (MMLV-Promega), 20 U de inibidor de RNase (RNAsin-Promega), em condições salinas adequadas e incubação a 37 °C por 60 min em termociclador (Techne PCR System Thermocycler -Flexigene®).

Após a síntese do cDNA, as reações de qPCR para os NoV GI e GII ocorreram em 25 µL de volume final (sendo 5µL de amostra), para cada genogrupo, contendo 12,5 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix, 2X concentrada (Applied Biosystems), mistura essa que contém os reativos necessários para a reação de PCR, como a enzima Taq DNA Polimerase, oligonucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) além das condições salinas adequadas. Os iniciadores e sondas utilizados foram descritos por KAGEYAMA et al. (2003) e usados nas concentrações finais de 0,25 µM para os iniciadores e 0,6 µM para as sondas. O protocolo com os tempos e temperaturas das reações para os dois genogrupos foi de 2 min a 50 °C, seguido de 10 min a 95 °C, e 45 ciclos de desnaturação a 94 °C por 20 s, e de 56 °C por 1 min tanto para anelamento dos iniciadores e sonda quanto para extensão dos iniciadores.

A fim de evitar inibidores nas reações enzimáticas de amplificação e para aumentar a sensibilidade da reação, as amostras foram analisadas em duplicata, em placa de 96 cavidades (MicroAmp Applied Biosystems), com diluições dos AN de 1:10 e 1:100. Foram incluídos controles negativos não inoculados em cada corrida de (RT)



qPCR. Todas as qPCR foram preparadas em laboratório livre de DNA, sendo as amostras adicionadas numa outra sala, assim como a inoculação dos padrões realizada em um outro laboratório, destinado a esta finalidade.

### **3.3.1.6 Análises de Compostos Orgânicos**

Uma alíquota de 20g de sedimento e 5g do tecido mole da ostra foi encaminhada ao Laboratório de Química Orgânica do Instituto Oceanográfico da USP para a análise dos pesticidas organoclorados, hidrocarbonetos alifáticos (HAs), bifenilas policloradas (PCBs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), alquilbenzeno lineares (LABs) e esteroides. Nos processamentos das amostras foi utilizada a análise cromatográfica, com metodologias, já padronizadas no Laboratório de Química Orgânica/USP (UNEP, 1992; MATOS, 2002 e MACLEOD et al., 1986). Nas detecções dos pesticidas organoclorados foi utilizado cromatógrafo a gás equipado com detector de captura de elétrons (GC-ECD) e com detector de ionização de chama (GC-FID) para os HAs (6890 da Agilent Technologies). Os demais grupos de compostos (HPAs, PCBs, LABs e esteroides) foram analisados em cromatógrafo a gás, equipado com espectrômetro de massas (GC-MS), também da Agilent Technologies (6890/5973N).

### **3.3.1.7 Análises histológicas**

As amostras foram processadas para análises histoquímica e morfológica em microscopia de luz e histoquímica. As secções foram coradas com Ácido Periódico de Schiff (PAS), utilizado para identificar a presença de polissacarídeos neutros (Schmidt *et al.* 2009) e com Azul Brillhante de Coomassie (CBB), para identificar a presença de proteínas totais (Schmidt *et al.* 2009). Também foram pesquisadas alterações morfológicas pela Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Todas as análises microscópicas foram realizadas pelo Laboratório de Marcadores Histo-Citológicos/BEG/UFSC, utilizando-se de metodologias já padronizadas nesse laboratório.

### **3.4 Análises estatísticas dos dados**

Foram utilizadas as seguintes ferramentas nas análises estatísticas realizadas nesta tese: (1) Microsoft Excel (Microsoft® Excel 2007 para Windows® (Correlação de Person e análise de Regressão Linear), capítulo I; (2) Prisma Software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) (ANOVA), capítulos II. Foi considerado significativo, o valor de  $P < 0,05$  e muito significativo o valor de  $P < 0,01$ .

## **4   CAPÍTULO I- *Análise da contaminação ambiental nas baías de Florianópolis, SC***

### **4.1   *Resultados***

#### **4.1.1   Análises Microbiológicas**

Os resultados das análises de bactérias, protozoários e vírus nas amostras de águas de cultivo e ostras dos pontos estudados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1-Quantificação dos patógenos humanos na água do mar e em ostras (após alocação por 14 dias), oriundas de 4 locais estudados, nas baías de Florianópolis (RIB, SAL, TAP e BUC) e no LCMM/UFSC, fornecedor das ostras.

AMOSTRAS	PATÓGENOS					
	HAV <sup>2,7</sup>	NoV <sup>2,7</sup>	GI	GII	Protozoários <sup>3</sup>	<i>E. coli</i> <sup>1,6</sup>
<b>RIB</b>						
Água do mar	1,9 x 10 <sup>5</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	23
Ostras	4,3 x 10 <sup>1</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nr <sup>5</sup>
<b>SAL</b>						
Água do mar	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	30
Ostras	5,0 x 10 <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nr <sup>5</sup>
<b>TAP</b>						
Água do mar	3,0 x 10 <sup>8</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	2,4 x 10 <sup>2</sup>
Ostras	7,0 x 10 <sup>4</sup>	1,9 x 10 <sup>5</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	<i>Cryptosporidium spp.</i>	nr <sup>5</sup>
<b>BUC</b>						
Água do mar	1,7 x 10 <sup>7</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	1,2 x 10 <sup>6</sup>	<i>Giardia duodenalis</i> (Assembléia A)	8,0 x 10 <sup>4</sup>
Ostras	3,7 x 10 <sup>5</sup>	7,5 x 10 <sup>13</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nr <sup>5</sup>
<b>LCMM</b>						
Água do mar	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>
Ostras	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>	nd <sup>4</sup>

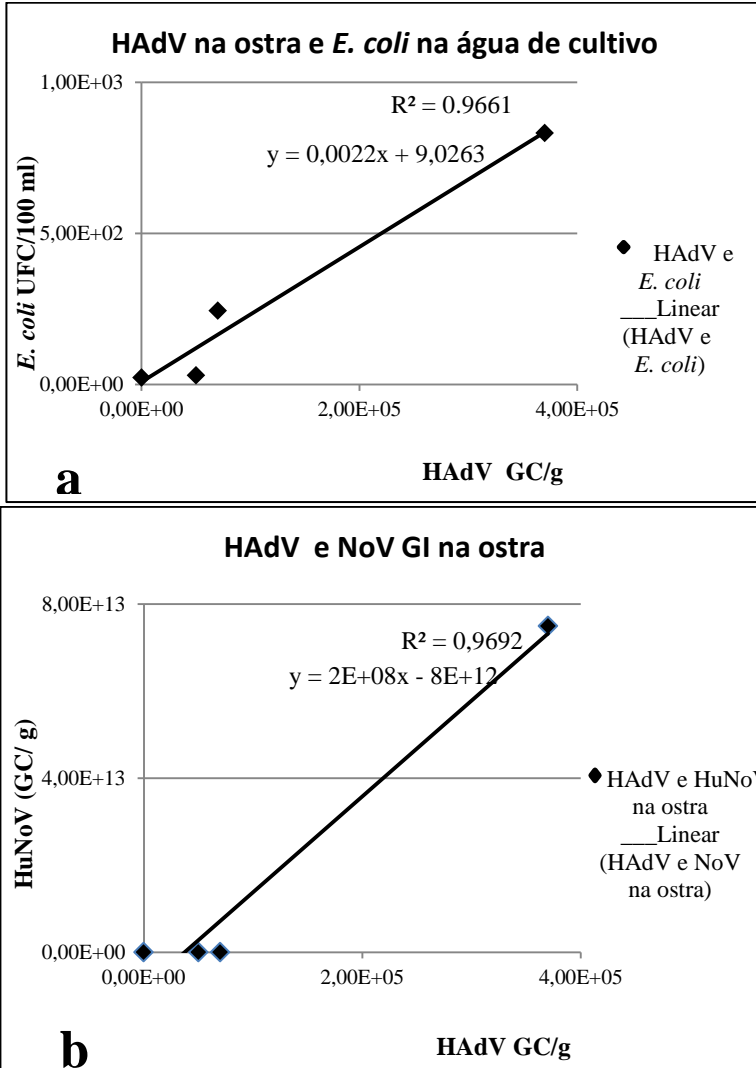
<sup>1</sup>NMP – Número Mais Provável, <sup>2</sup>(RT) qPCR, <sup>3</sup>IMS-IFA, <sup>4</sup>não detectado, <sup>5</sup>UFC/100mL, unidade formadora de colônia por 100 mL, <sup>6</sup>GC g<sup>-1</sup> ou L<sup>-1</sup> - cópias genômicas por grama ou por litro. No LCMM-UFSC foi encontrado JCPyV (6.2 x 10<sup>4</sup> GC g<sup>-1</sup>) e somente no BUC se encontrou HAV (9,9 X 10<sup>3</sup> GC g<sup>-1</sup>) e *Salmonella* sp. nas ostras. **Locais:** Ribeirão da Ilha (RIB); Santo Antônio de Lisboa (SAL); Tapera (TAP); Estuário do Rio Itchelele (BUC) e Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos da UFSC (LCMM-UFSC).

No LCMM-UFSC, tempo zero, o JCPyV foi detectado nas ostras ( $6.2 \times 10^4$  GC  $g^{-1}$ ) sendo que as mesmas foram negativas para os demais microrganismos investigados. Através da análise da Correlação de Pearson, observou-se que houve uma correlação (0,98) entre *E. coli* na água e o HAdV nas ostras. Foi também detectada por esta ferramenta estatística uma correlação entre HAdV e NoV GI nas ostras (0,98). Esses mesmo dados (*E. coli*, HAdV e NoV GI) avaliados em conjunto (através da equação de Regressão Linear) apresentaram um  $R^2$  acima de 0,96, predizendo o comportamento dessas variáveis (HAdV na ostra x *E. coli* na água de cultivo ou NoV GI na ostra x HAdV na ostra) nestas mesmas matrizes amostrais, água de cultivo e ostras (Figura 19).

As amostras de TD de ostras, onde os HAdV foram detectados por qPCR, foram submetidas aos ensaios de viabilidade (infecciosidade viral) destes vírus, por Placa de Lise. Porém estes ensaios não detectaram HAdV infecciosos.

*Salmonella* sp. foi encontrada somente no BUC, local com maior impacto antrópico e apresentando a maior diversidade de patógenos encontrados neste trabalho (Tabela 1). Esta bactéria não foi detectada nos demais pontos, mesmo em TAP que é um local de grande circulação de barcos e próximo a um bairro populoso, com baixa cobertura de coleta de esgoto, considerado impróprio para o cultivo de moluscos bivalves.

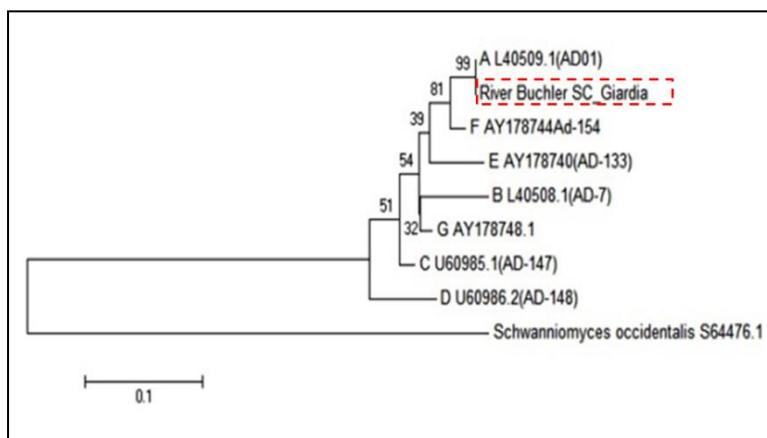
**Figura 16-Relação entre os patógenos HAdV e *E.coli* (a) e HAdV e HuNoV GI (b), em amostras de ostras e água de cultivo dos 4 locais estudados, em Florianópolis (RIB, SAL, TAP e BUC), obtida através de Regressão Linear.**



Fonte: Própria autora

Os cistos de *Giardia* detectados (Tabela 1) na amostra de água de cultivo, em BUC, foram submetidos ao sequenciamento de dois fragmentos distintos do gene  $\beta$ -Giardin, sendo classificados como pertencentes à espécie *duodenalis* (Assembléia A), que pode ser isolada a partir de fezes humanas (Figura 17) (SOUZA et al. 2012).

**Figura 17-Análise filogenética da *Giardia duodenalis* (Assembléia A) detectada nas águas do estuário do rio Bücheler.**



Fonte: Própria autora

#### 4.1.2 Compostos Orgânicos

Os resultados das análises dos pesticidas, HAs, HPAs, PCBs, LABs e esteróides nos sedimentos e nas ostras, que foram realizados pelo Laboratório de Química Orgânica do Instituto Oceanográfico da USP, são apresentados na Tabela 2. As maiores concentrações de pesticidas organoclorados totais nas amostras de sedimento foram de HCHs, no BUC e os DDTs, no LCMM-UFSC. Nas ostras os pesticidas organoclorados apresentaram valores abaixo do limite de detecção do método (LDM). BUC, também apresentou a mais alta concentração de HAs, no sedimento e nas ostras, dentre os 5 pontos analisados. Uma análise mais aprofundada dos hidrocarbonetos encontrados nas amostras constatou que os mesmos eram predominantemente de contribuição biogênica, exceto os do BUC, que

apresentaram contribuição de hidrocarbonetos provenientes de óleos. Os sedimentos analisados neste trabalho apresentaram uma variação de HPAs de 12,3 a 112,1 ng g<sup>-1</sup>. O mais alto valor encontrado nas amostras de ostras foi no BUC (1.594 ng g<sup>-1</sup>). As amostras de sedimento e ostras deste ponto, também apresentaram os valores mais elevados de LABs (Tabela 2).

As concentrações dos demais pesticidas organoclorados e dos PCBs de todas as amostras avaliadas apresentaram-se abaixo dos limites de detecção dos métodos utilizados.

As concentrações de esteroides totais nos sedimentos variaram de 0,88 a 6,01 µg g<sup>-1</sup> peso seco. A maior concentração foi encontrada no sedimento de BUC, seguido por SAL e RIB. Segundo GONZALEZ-OREJA e SAIZ-SALINAS (1998), concentrações de coprostanol maiores que 0,10 µg g<sup>-1</sup> indicam a contaminação por esgoto num ambiente. TAP e BUC apresentaram concentração de coprostanol acima desse limite (Tabela 2). Não foram investigados esteroides nos tecidos das ostras.

**Tabela 2-Concentrações dos Compostos orgânicos (ng g<sup>-1</sup> peso seco), nas ostras (Ost) e sedimentos marinhos (Sed), dos 4 locais estudados e no LCMM/UFSC.**

	RIB		SAL		TAP		BUC		LCMM-UFSC	
	Ost	Sed	Ost	Sed	Ost	Sed	Ost	Sed	Ost	Sed
Σ-HCH	<1,02	<0,07	<1,02	0,23	<1,02	<0,07	<1,02	0,36	<1,02	0,25
Σ-DDTs	<1,89	1,58	2,03	3,78	<1,89	1,26	2,05	2,89	1,96	11,86
ΣHAs (µg g <sup>-1</sup> )	3,84	3,67	13,7	18,4	4,62	3,06	28,3	52,6	12,7	10,0
ΣHPAs	138	14,5	135	96,9	69,0	12,3	1594	112,1	19,6	88,2
ΣLABs	60,4	12,1	32,1	<0,99	50,0	<0,99	1350	108	42,3	1,56
Coprostanol (µg g <sup>-1</sup> )	na*	0,08	na*	0,05	na*	0,10	na*	2,55	na*	0,02
Epicoprostanol (µg g <sup>-1</sup> )	na*	0,02	na*	<0,010	na*	<0,010	na*	0,42	na*	<0,010
ΣEsteróides (µg g <sup>-1</sup> )	na*	5,02	na*	1,24	na*	5,51	na*	6,01	na*	0,88

\*não analisado. **Outras referências:** HCH em águas salinas onde ocorre cultivo de moluscos bivalves, valor máximo permitido de 0,00029 µg L<sup>-1</sup> (BRASIL, 2005); DDTs o valor máximo permitido em águas salinas é de 0,001 µL<sup>-1</sup> (BRASIL, 2005); HAs, 5 e 10 µg g<sup>-1</sup>, sedimentos marinhos e estuarinos, respectivamente, em ambientes não poluídos (NRC, 1985; UNEP,



1992 e VOLKMAN et al., 1992); HPAs em locais considerados moderadamente poluídos: entre 250 a 500 ng g<sup>-1</sup>, no sedimento (NOTAR et al., 2001) e entre 100 e 1000 ng g<sup>-1</sup>, nas ostras (BAUMARD et al., 1998);

O teste de Correlação de Pearson apontou correlação entre a presença de HPAs e HAdV (0,98), também entre este vírus e LABs (0,98) e entre HPAs e LABs (0,99), todos nas ostras.

A granulometria das amostras de sedimento foi feita através de identificação visual (peneira) e mostrou que todas as amostras são compostas predominantemente de areia muito fina, o que não favorece o acúmulo dos contaminantes analisados.

A salinidade medida nos pontos de coleta foi de 33±2 e a média dos índices pluviométricos para os 14 dias de alocação foi de 2 mm, segundo dados fornecidos pela EPAGRI.

## **4.2 Discussão**

Estudos previamente realizados pelo LVA-UFSC, nos mananciais e na região costeira de Florianópolis, evidenciaram o impacto da urbanização nestes ambientes (RIGOTTO et al. 2010; MORESCO et al. 2012). Estes estudos, envolvendo diversas matrizes de água, mostraram que os patógenos humanos virais de veiculação hídrica, vêm sendo detectados com frequência, o que é motivo de grande preocupação, pois por serem microrganismos muito resistentes nestes ambientes e por necessitarem de baixas doses infecciosas, podem causar doenças. Quando moluscos bivalves são cultivados em águas contaminadas, se tornam vetores de diversas doenças, sendo uma ameaça à saúde de seus consumidores. Uma parte importante do cultivo de bivalves em Florianópolis, RIB, localiza-se na baía sul desta ilha, local incluído como objeto de estudo nesta tese, pois é responsável por cerca de 60% da produção de ostras do município (SANTOS et al. 2013). Todos estes fatores reforçam a relevância das análises realizadas nesta etapa do projeto. Nas regiões costeiras são aportadas contaminações provenientes de processos naturais, como erosão, e da influência antrópica, como a emissão de esgotos. A grande faixa litorânea brasileira permite um crescimento expressivo das atividades relacionadas à aquicultura, mas em contrapartida sofre com a pressão exercida pela urbanização não planejada, já que a maior parte da população no Brasil se concentra nas regiões litorâneas (IBGE 2011). Embora parte da contaminação que chega às regiões

costeiras seja sanada pelas dinâmicas intrínsecas destes locais (salinidade, incidência de radiação UV, etc), parte dela permanece inalterada, possibilitando sua deposição nos sedimentos marinhos, ocasionando oscilações na qualidade das águas de cultivo. Processos de remobilização, abióticos (variações das condições ambientais) e/ou bióticos (bioturbação), permitem a disponibilização de partículas acumuladas nos sedimentos marinhos para a coluna d'água afetando a qualidade sanitária dos moluscos bivalves produzidos nestes locais (D'AQUINO et al. 2006).

Resultados, como os encontrados neste trabalho, evidenciam os riscos sofridos pela maricultura quando medidas preventivas da contaminação marinha não são realizadas. Embora dois dos pontos analisados neste estudo não sejam próprios para o cultivo de moluscos, por seus parâmetros de *E. coli* elevados (investigados somente na água de cultivo de acordo com a Resolução 357/2005, CONAMA, já que a exigência do monitoramento de *E. coli* nos tecidos dos moluscos bivalves, pelas legislações brasileiras, se iniciou somente em 2012, com a Portaria 204/2012), a proximidade entre os locais avaliados (próprios e impróprios para maricultura) neste estudo aumenta a preocupação com os resultados obtidos (BRASIL, 2005 e 2012).

Achados de contaminação de água e ostras por patógenos humanos são relatados por outros autores, em diversos locais (ALBINANA-GIMENEZ et al. 2009b; THOMAS et al. 2011; LEAL et al. 2013). Estudos realizados em matrizes de águas e de moluscos em Florianópolis têm apresentado, com o passar dos anos, a presença de patógenos humanos nestas matrizes. ALBARNAZ et al. (2007), em um estudo com duração de 10 meses, avaliando a presença da bactéria *Salmonella* sp. nas ostras e em fezes de gaivotas, presentes nas fazendas marinhas das baías de Florianópolis, detectou esta bactéria nas ostras (3 de 10 amostras) e nas fezes destas aves (6 de 10 amostras). Na investigação realizada no presente estudo, essa bactéria foi encontrada contaminando as ostras alocadas no BUC, confirmando a permanência da contaminação deste patógeno nas baías de Florianópolis. A ausência da detecção desta bactéria nas amostras de 12 ostras, dos outros três pontos de alocação, liberariam estes moluscos para a venda e consumo por humanos, segundo a legislação vigente no país (BRASIL, 2001), embora patógenos humanos virais e protozoários tenham sido detectados nas amostras. Como foi

observado no estudo realizado por ALBARNAZ et al. (2007), não houve correlação entre o achado de *Salmonella* sp. e *E. coli*.

Estudos relatando a contaminação por patógenos virais humanos, também evidenciaram a frequência e a diversidade com que eles aparecem nessas matrizes amostrais (água e ostras) em Florianópolis. Numa investigação utilizando-se metodologias moleculares, COELHO et al. (2003) detectaram HAV em amostras de ostras coletadas nestas baías, detecção que se manteve num estudo realizado por SINCERO et al. (2006), realizado de dezembro/2002 a julho/2004. MORESCO et al. (2012), em 132 coletas (água) realizadas em 11 praias, em Florianópolis, por um ano, inclusive em pontos dentro das baías, obtiveram 51,5% de detecção de HAV nestas amostras, utilizando metodologias moleculares. Além desta espécie viral, ainda foram detectados o HAdV (55%), HuNoV GI (7,5%), GII (4,5%) e JCPyV (3%), mas também não havendo correlação entre o achado destes vírus e a presença de *E. coli*.

PILOTTO (2011), em dados ainda não publicados, em coletas mensais de ostras e água de cultivo, de fevereiro a setembro de 2011, realizadas em um ponto da baía Norte de Florianópolis (próximo ao bairro Saco Grande), detectou HAdV em 50% das amostras de ostras e de 62,5% nas amostras de água. Destas detecções, foi confirmada a infecciosidade viral por Placa de Lise em uma amostra de água. No estudo ainda se detectou HAV nas amostras (2 em 8 amostras de ostras e 1 em 8 amostras de água), mas HuNoV GI/GII e JCPyV não foram encontrados por (RT) qPCR. Além destes vírus foi encontrado *Salmonella* sp. em 4 amostras de ostras e *E. coli* em 3 amostras de água (de 400 a 2400 UFC/100mL), mas não houve correlação deste parâmetro com o achado dos demais microrganismos investigados.

VICTORIA et al. (2009), numa pesquisa realizada em matrizes de água (do mar, de consumo, superficial e em esgoto tratado em Florianópolis, por um ano, obtiveram uma detecção de 23% para os HuNoV. Desta porcentagem, 68% eram do genogrupo II, enquanto que o restante, 36%, pertencia ao genogrupo I.

No presente estudo, os HuNoV foram encontrados em amostras de ostras e de água em dois locais, TAP e BUC. Outros autores já relataram que o GI se encontra mais frequentemente relacionado à contaminação de ostras *C. gigas* (MAALOUF et al. 2010a), enquanto o GII é mais frequente em outras amostras, principalmente em períodos de surto por HuNoV (MAALOUF et al. 2011). Essa

tendência foi observada no presente estudo, já que as duas detecções do GI ocorreram em matrizes de *C. gigas* e a do GII, em água. Nas ostras coletadas no BUC, a quantidade de cópias genômicas de NoV GI detectadas ( $10^{13}$ /g) reforça a afirmação feita por outros autores de que este genogrupo é capaz de se manter por maior período de tempo nos tecidos do molusco, por serem adsorvidos às suas células, dificultando sua remoção (MCLEOD et al. 2009; LE GUYADER et al. 2012).

RIGOTTO et al. (2010), em estudo realizado em dois pontos de cultivo de moluscos nas baías de Florianópolis durante um ano (junho/2007 e maio/2008), obtiveram detecção dos genomas de HAdV (64,2% das amostras de água e 87,5% das amostras de ostras), HAV (8,3% das águas, mas nenhuma detecção em ostras), além de RVA (19% em água e 8,3% em ostras). Após a aplicação de metodologias que atestavam a viabilidade viral, a autora constatou que havia partículas virais infecciosas de HAdV e de RVA nas amostras, porém não encontrando HAV viáveis. No presente estudo, HAdV foi o patógeno mais prevalente, mas apesar de ser detectado em várias amostras, este não apresentou infecciosidade, quando submetido aos ensaios de Placa de Lise. Os estresses ambientais, como a salinidade marinha e a incidência de UV da luz solar, pode ter ocasionado a inativação destes vírus nas ostras.

No Brasil, a portaria 2914/2011 orienta sobre a qualidade da água de consumo humano, fazendo uma recomendação, não uma exigência para a investigação viral na amostra, (art.11) (BRASIL, 2011). Mas para águas destinadas à recreação e à aquicultura, as legislações existentes ainda se atêm aos parâmetros bacterianos. Nas ostras, a portaria 204/2012, requer somente o monitoramento de *E. coli*, nos tecidos dos moluscos, deixando de fora, os demais patógenos humanos que podem ser veiculados por estes bivalves, como os vírus e protozoários (BRASIL, 2012b).

Os resultados do Capítulo I deste estudo evidenciaram a diversidade dos patógenos humanos presentes nas baías de Florianópolis, fato que aumenta os riscos da utilização dessas águas para fins recreativos, mas um risco ainda maior para os consumidores de moluscos, principalmente ostras *in natura*. Por serem os protozoários e os vírus entéricos mais resistentes aos estresses ambientais do que as bactérias (*E. coli* e *Salmonella* sp.), a liberação para venda dos moluscos cultivados em áreas, cujos parâmetros

bacterianos estejam nos limites exigidos pelas legislações vigentes, não afasta o risco outras de doenças associadas ao consumo de bivalves. Trabalhos relatando a presença dos protozoários estudados em ostras, em Florianópolis, ainda não estavam disponíveis até o fechamento destes resultados, ressaltando a importância da medida da contaminação microbiológica realizada nesta etapa. A baixa temperatura da água do mar no período da alocação (inverno) pode ter favorecido o aumento da diversidade dos patógenos encontrados (principalmente os vírus, pois são mais sensíveis ao aumento da temperatura) e a menor quantidade de chuvas nesse período, pode ter dificultado o achado das bactérias estudadas, já que estes microrganismos são menos resistentes à salinidade.

Embora quando se aborda a contaminação marinha por compostos orgânicos o maior enfoque seja normalmente dado às áreas costeiras (por serem os receptores diretos de dejetos urbanos, industriais e de rios), o oceano como um todo merece consideração, porque os POPs estendem os limites da sua distribuição por todo o ecossistema marinho (GARCIA et al. 2000).

As contribuições ocasionadas pelos compostos orgânicos como os DDTs mostraram-se menores, quando comparadas aos valores encontrados em outros estudos no Brasil (SANTOS et al. 2001; TANIGUCHI 2002). Segundo alguns autores, pesticidas organoclorados podem ser detectados durante anos nos solos (inclusive nos sedimentos), mesmo sem a continuidade da sua utilização naquele local (CARLOS et al. 2011). A contaminação encontrada nestas matrizes aumenta a possibilidade da disponibilização desta substância na coluna d'água, podendo ser bioacumuladas pelas ostras, como aconteceu nas ostras coletadas em SAL, BUC e no LCMM-UFSC.

Concentrações dos HAs encontrados em sedimentos de ambientes não poluídos apresentam valores médios de  $5 \mu\text{g g}^{-1}$  (NRC 1985; UNEP 1992), chegando a  $10 \mu\text{g g}^{-1}$  em sedimentos estuarinos e até maiores onde há contribuição significativa de plantas superiores (VOLKMAN et al. 1992). Nas amostras analisadas na atual pesquisa, somente dois dos cinco locais estudados, apresentavam valores compatíveis aos sedimentos de locais não poluídos. O sedimento de BUC, além de apresentar a maior concentração de HAs, dentre os demais locais, foi o único associado à contaminação por óleos.

Os HPAs estão presentes na composição do petróleo e derivados, mas também podem se originar da queima de combustíveis fósseis e, em menor proporção, da queima de biomassa vegetal (LAW e BISCAYA 1994). A variação de HPAs encontrada nos sedimentos analisados nesta tese, quando comparada aos valores encontrados num estudo realizado no Mar Adriático, por NOTAR et al. (2001) classificaria os locais analisados em Florianópolis, como possuidores de sedimentos levemente contaminados. Segundo estes autores, em regiões moderadamente contaminadas as concentrações de HPAs no sedimento, variam de 250 a 500 ng g<sup>-1</sup>. BAUMARD et al. (1998) classificaram como ambientes pouco poluídos aqueles cujas concentrações de HPAs nas ostras eram menores que 100 ng g<sup>-1</sup> e moderadamente poluídos os com concentrações entre 100 e 1000 ng g<sup>-1</sup>. Baseado neste parâmetro, os dois locais estudados tradicionalmente utilizados para cultivo de bivalves nesta tese, RIB e SAL, estariam enquadrados como moderadamente poluídos. As amostras de ostras de BUC apresentaram valor superior ao máximo aceito para locais moderadamente contaminados, segundo esses mesmos autores, embora a concentração de HPAs nos sedimentos deste mesmo local o classifique como levemente contaminado (NOTAR et al. 2001).

O uso dos esteroides como indicadores de poluição fecal é particularmente aplicável a regiões próximas a grandes centros populacionais e industriais onde são encontradas fontes de descarga de efluentes domésticos na maioria das vezes tratados primariamente, sendo o homem a principal fonte dos esteróis fecais (MARTINS et al. 2008). O coprostanol é um esteroide fecal gerado através da ação microbiana sobre o colesterol (principal produto metabólico em mamíferos superiores), e citado como indicador químico de poluição fecal, devido a sua presença nas fezes humanas (SHERWIN et al. 1993). O epicoprostanol também é um esteroide fecal, mas que podem ser gerados a partir dos processos de digestão aeróbicos de lodos nas estações de tratamento de esgotos (LE BLANC et al. 1992; MUDGE e SEGUEL 1999). A associação dos dois em uma amostra sugere a contaminação dessa matriz por esgoto (GREEN e NICHOLS 1995). A amostra de sedimento de BUC apresentou o valor mais alto de coprostanol, evidenciando a maior contaminação por esgoto quando comparado com os demais pontos de coleta.

A granulometria dos sedimentos nos locais de coleta, com maior proporção de areia, indicou que a constituição deles não

favoreceu o acúmulo dos compostos orgânicos nestes sedimentos, provavelmente ocasionando os valores mais baixos nestas matrizes. A adsorção de contaminantes orgânicos está intimamente relacionada com a distribuição granulométrica dos sedimentos, ou seja, quanto maior a proporção de finos (silte e argila) maior a capacidade de reter os contaminantes como os hidrocarbonetos (KOWALSKA et al. 1994; KUBICKI e APITZ 1999). Este fato é evidenciado pela concentração de HPAs observada nos tecidos das ostras, quando comparadas às encontradas nos respectivos sedimentos marinhos. Sendo sempre os valores encontrados nos moluscos, superiores aos dos sedimentos.

SOUZA et al. (2012) constataram que a atividade de glutathione S-transferase (GST) nestas mesmas amostras ostras de BUC, apresentava-se aumentada quando comparada aos valores encontrados nos pontos de alocação mais limpos, RIB e SAL, fato que pode estar associado ao aumento da biotransformação de contaminantes nesses moluscos.

Os dados exibidos neste capítulo foram publicados na revista *Ecotoxicology and Environmental Safety*, no ano de 2012 e o artigo encontra-se disponível no Apêndice B da tese.

## 5 CAPÍTULO II- Cinética da descontaminação química e microbiológica durante depuração em pontos de venda de ostras vivas

### 5.1 Resultados

Durante os 14 dias das alocações das ostras nos locais estudados, em diferentes semanas, a média da precipitação pluviométrica foi de 10,5; 2,3; 4,8 e 3,6 mm, para RIB, SAL, TAP e BUC, respectivamente.

Nos ensaios de depuração de cada local estudado, realizou-se o monitoramento de alguns parâmetros nas águas dos tanques de depuração, durante os sete dias, apresentando os seguintes resultados: salinidade média dos pontos foi de  $33 \pm 2$  ppm; sendo a média do pH, 7,8; da temperatura, 20,8°C e do oxigênio dissolvido,  $6,2 \text{ mgL}^{-1}\text{O}_2$ .

#### 5.1.1 Bioacumulação Viral realizada em laboratório

Antes que as ostras fossem contaminadas artificialmente com os dois vírus utilizados como controles virais para as depurações (MNV-1 e HAdV2), através do processo de bioacumulação, foi realizado um teste piloto de bioacumulação, com o objetivo de se escolher o melhor tempo de contato entre os vírus e os moluscos (Tabela 3).

**Tabela 3-Quantidade média cópias genômicas (GC) de HAdV2 e MNV-1 nas águas de cada aquário, disponíveis para serem bioacumulados por 4 dúzias de ostras, durante 24 h.**

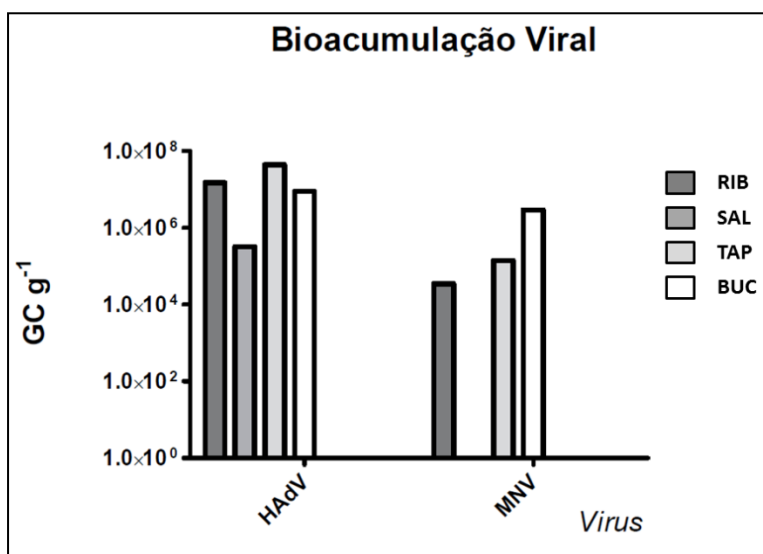
VÍRUS	TEMPO (h) DE BIOACUMULAÇÃO			
	Na água do aquário (GC mL <sup>-1</sup> )	Vírus nas ostras (GC g <sup>-1</sup> )		
		3	8	24
HAdV2	$2,0 \times 10^8$	$8,6 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$5,9 \times 10^8$
MNV-1	$4,0 \times 10^7$	$2,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$



Após a realização deste ensaio, foi escolhido o tempo de 3 h, pois a quantidade bioacumulada dos vírus era suficiente para observar o decaimento, de até 4 logs (99,99%), durante os experimentos de depuração, e o menor tempo de bioacumulação permitia que as ostras fossem colocadas nos tanques de depuração mais rapidamente.

As bioacumulações realizadas para os quatro locais obedeceram a este mesmo protocolo, inclusive na quantidade de vírus acrescentadas aos aquários (exceto para SAL, que recebeu só o HAdV, mas também segundo a quantidade estabelecida neste piloto de bioacumulação). Os resultados das quantificações virais realizadas nas ostras, logo após a bioacumulação viral, são apresentados na Figura 18. Embora a quantidade bioacumulada de HAdV tenha sido maior do que a de MNV-1 em RIB, TAP e BUC, estas quantidades foram maiores do que  $10^4$  GC  $g^{-1}$  para os dois vírus-modelo, sendo que a menor quantidade de MNV-1 bioacumulada ocorreu em RIB ( $3,5 \times 10^4$  GC  $g^{-1}$ ) e de HAdV ocorreu em SAL ( $3,2 \times 10^5$  GC  $g^{-1}$ ).

**Figura 18-Quantificações, por (RT) qPCR, dos genomas virais bioacumulados pelas ostras alocadas nos 4 locais estudados: Ribeirão da Ilha (RIB), Santo Antônio de Lisboa (SAL), Tapera (TAP) e estuário do rio Bücheler (BUC).**



## 5.1.2 Vírus e Protozoários

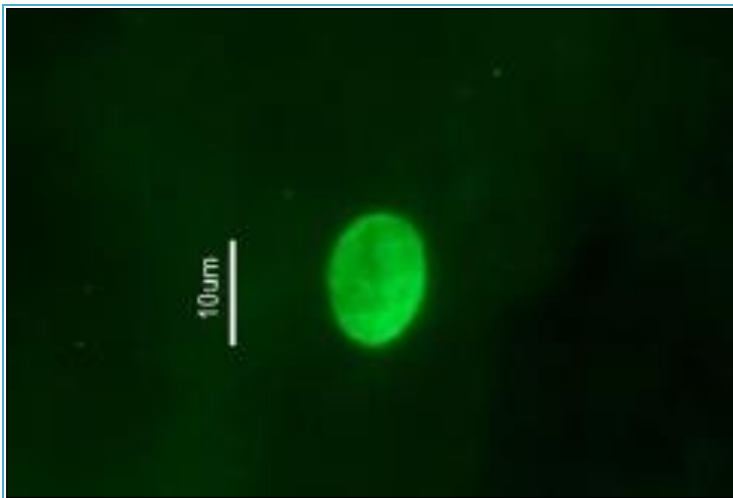
### 5.1.2.1 Ostras após permanência por 14 dias nos locais estudados

Os vírus e protozoários investigados, imediatamente após a retirada das ostras dos quatro locais estudados, (RIB, SAL TAP e BUC) foram os mesmos investigados na primeira etapa deste trabalho, relatada no Capítulo I. Não foram investigadas bactérias nesta etapa do projeto. Somente amostras de ostras foram processadas.

Dos vírus pesquisados, somente o HAdV foi detectado nas ostras, estando presente nas amostras de todos os locais estudados ( $7,7 \times 10^6$ ;  $6,2 \times 10^5$ ;  $4,4 \times 10^7$  e  $3,2 \times 10^6$  GC g<sup>-1</sup>, em RIB, SAL, TAP e BUC, respectivamente).

Não foram detectados oocistos de *Cryptosporidium*, mas cistos de *Giardia* foram encontrados nas ostras de BUC (Figura 19).

**Figura 19-Cisto de *Giardia* spp., marcado por Imunofluorescência, isolado de uma amostra do BUC.**



**Foto:** Dr. Diego Guiguet Leal.

### 5.1.2.2 Depurações de ostras com Lâmpadas UV de Diferentes Potências.

Apesar dos protozoários investigados não terem sido detectados na maioria das amostras (somente em BUC, antes das depurações), os mesmos foram detectados em três dos quatro locais estudados, durante as depurações (Tabela 4). Cistos de *Giardia* spp. foram detectados nas ostras depuradas provenientes de RIB e SAL, oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram detectados nas ostras depuradas oriunda de BUC. Os protozoários foram detectados nas amostras de ostras ao final das depurações, independentemente da dose de UV aplicada na água de depuração.

**Tabela 4-Resultados encontrados de (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., nas amostras depuradas, após 7 dias, dos 4 locais estudados em Florianópolis.**

Local	Tempo total de depuração (n = 7 dias)					
	36 W		18 W		Sem UV	
	Brânquias	Água interna	Brânquias	Água interna	Brânquias	Água interna
RIB	<u>nd</u>	<u>nd</u>	<u>nd</u>	<u>nd</u>	<i>Giardia</i> spp.	<u>nd</u>
SAL	<u>nd</u>	<i>Giardia</i> spp.	<u>nd</u>	<u>nd</u>	<u>nd</u>	<u>nd</u>
TAP	<u>nd</u>	<u>nd</u>	<u>nd</u>	<u>nd</u>	<u>nd</u>	<u>nd</u>
BUC	<u>nd</u>	<u>nd</u>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<u>nd</u>	<u>nd</u>	<u>nd</u>

nd=não detectados

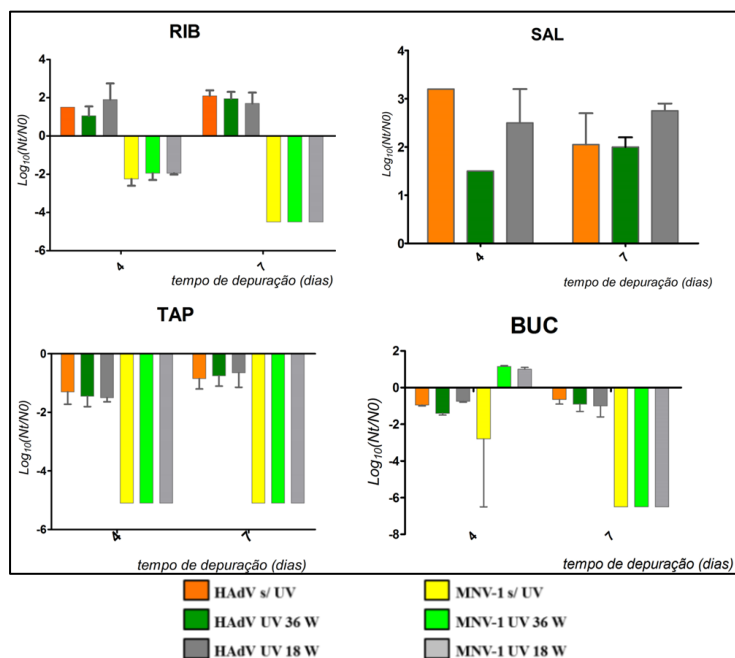
#### 5.1.2.2.1 Ostras artificialmente contaminadas ( HAdV2 e MNV-1)

O HAdV se apresentou como o mais resistente, pois seu genoma foi detectado até o final do experimento de depuração, 7 dias, em amostras de todos os locais estudados, independentemente do tratamento (com ou sem UV) aplicado durante as depurações (Figura 20). Em SAL, ocorreu um aumento na detecção dos genomas de HAdV, pelo qPCR, até o final das depurações, nos 3 tratamentos aplicados. Nos outros três locais onde se realizou a contaminação artificial com os 2 vírus-modelo, só se observou redução de HAdV em TAP e BUC, mas esta redução foi inferior a 2 log (Figura 20). RIB

apresentou um aumento na detecção destes genomas, com o passar do tempo de depuração, nos 3 tratamentos, sendo detectados aproximadamente 2 log a mais ao final do experimento. Submetidos ao teste estatístico ANOVA, os resultados obtidos desses 3 locais não mostraram diferenças quanto ao comportamento (aumento ou redução na detecção) dos genomas virais expostos ou não a UV, já TAP apresentou diferença ( $P=0.0205$ ) quando se comparou os tempos testados (T0, T4 e T7 dias), mas não aos tratamentos aplicados. Ao se comparar somente as amostras tratadas com UV 36 W dos 3 grupos, detectou-se diferenças entre o local mais limpo, RIB e os dois mais contaminados, TAP e BUC ( $P<0,01$ ), pela ANOVA e Teste de Bonferroni.

O MNV-1 diferiu quanto à estabilidade do seu genoma, durante as depurações, quando comparado ao HAdV. Houve um decaimento rápido deste genoma, não sendo mais detectado após 4 dias em dois dos três pontos onde foi avaliado (Figura 20). No BUC observou-se um aumento de menos que 1 log deste genoma, nas depuradoras onde se utilizou tratamento UV, após 4 dias, não havendo detecção nas depuradoras controles, ou seja, sem UV. Foram detectadas diferenças estatísticas pela ANOVA e Teste de Bonferroni, entre os tempos de depuração das ostras de RIB ( $P<0.0001$ ) e BUC ( $P<0.0022$ ), mas não dentre os tratamentos (UV) aplicados nestas depurações, como ocorreu com os genomas do HAdV.

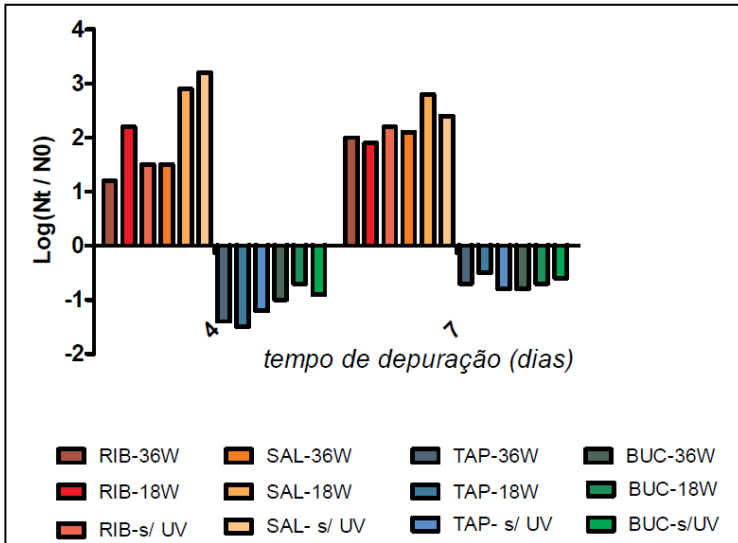
**Figura 20-**Decaimento de HAdV e MNV-1 (em ostras vindas de 4 pontos de alocação), durante depurações com UV 36 W, 18W e sem UV, por 7 dias.



#### 5.1.2.2.2 *Ostras naturalmente contaminadas com HAdV nos 4 locais estudados*

As detecções de HAdV, nas ostras naturalmente e nas artificialmente contaminadas, seguiram a mesma tendência nos tempos de depuração analisados (Figura 20 e Figura 21), mesmo havendo diferenças no número de ostras coletadas por amostra (12 nas naturalmente contaminadas e 3 nas artificialmente contaminadas, por amostra). Houve aumento de sua detecção nos pontos mais limpos, com o passar do tempo de depuração e uma redução de aproximadamente 1,5 log nos pontos mais contaminados. Não foram observadas diferenças relacionadas aos tratamentos de depuração aplicados.

**Figura 21-Resultados das quantificações de HAdV em ostras depuradas (depurações com UV de diferentes potências) por 7 dias, naturalmente contaminadas por este vírus, nos locais estudados. Cada amostra consistiu em 12 ostras.**



### 5.1.2.3 Ostras Depuradas nos Restaurantes

As entregas das amostras depuradas por 4 dias, com UV 36 W, realizadas pelos comerciantes de ostras, não seguiram o mesmo ritmo em todos os pontos de coleta, frente aos contratempos ocasionados por problemas particulares dos comerciantes (férias coletivas na baixa temporada e obras nos estabelecimentos), pela troca de equipamentos (bombas hidráulicas) e pelo aumento da temperatura ambiente, ocasionando a interrupção de alguns ensaios, sendo necessária a compra de resfriadores da água de depuração (*chiller*), para que fossem acoplados às depuradoras utilizadas. Foram analisadas um total de 43 amostras e somente em uma amostra foi detectado genoma viral, de HAdV ( $7,3 \times 10^7 \text{ GC g}^{-1}$ ); não foram detectados genomas dos outros 4 vírus investigados (HAV, HuNoV GI e GII, JCPyV) em nenhuma das amostras. Não foi detectada infecciosidade do HAdV encontrado, pelo ensaio de Placa de Lise realizado.

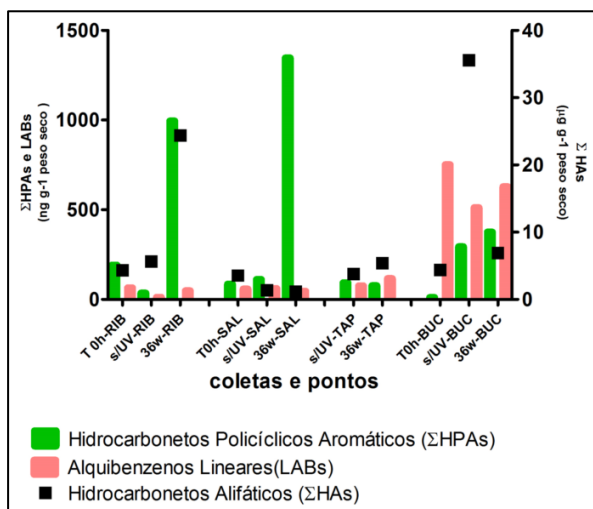
O modelo do laudo virológico das ostras, fornecidos aos comerciantes, está disponível no Apêndice C deste trabalho.

### 5.1.3 Compostos Orgânicos nas ostras

Não foram detectados PCBs e OCs nos tecidos das ostras que permaneceram alocadas nos 4 pontos de cultivo. As análises do T14 dias (que também foi o T0 h da depuração) de TAP, não foram realizadas, devido à morte dos animais ocorrida durante o envio para o laboratório da USP, responsável pelas análises, ocasionada por atrasos na entrega.

As concentrações encontradas de HAs, HPAs e LABs nas amostras dos quatro sítios de alocação, são apresentadas na Figura 22, sendo o valor do T0 h da depuração equivalente ao T14 dias de alocação. As análises desses compostos orgânicos, embora não realizados no T0 h da depuração, na TAP, foi realizado após 7 dias também nas amostras deste ponto.

**Figura 22-Concentrações dos compostos orgânicos encontrados nas ostras), antes e após os ensaios de depuração, por 7 dias: T0h (14 dias no ambiente, antes da depuração), sem UV e com UV 36W.**



**Locais:** Ribeirão da Ilha (RIB), Santo Antônio de Lisboa (SAL), Tapera (TAP) e estuário do rio Bücheler (BUC).

Não foi possível relacionar as variações de HAs e LABs, aos tratamentos aplicados nas depurações (Figura 22). Observou-se um aumento na concentração dos ΣHPAs nas amostras de RIB, SAL e BUC, tratadas com UV 36 W por 7 dias, em relação aos valores encontrados no T0 h da depuração. Ao aplicarmos a Correlação de Pearson, foi detectada uma forte correlação entre ΣHPAs e LABs nas depurações, sem tratamento UV ( $r=0,98$ ), já nas depurações com UV de 36 W, essa correlação foi negativa ( $r=-0,48$ ).

Correlação entre a detecção de HAdV e compostos orgânicos ocorreu somente entre ele e ΣHPAs ( $r = -0.59$ ), sem tratamento UV e dele com LABs ( $r=-39$ ), com UV 36 W, mas não foi detectada correlação com o HAs.

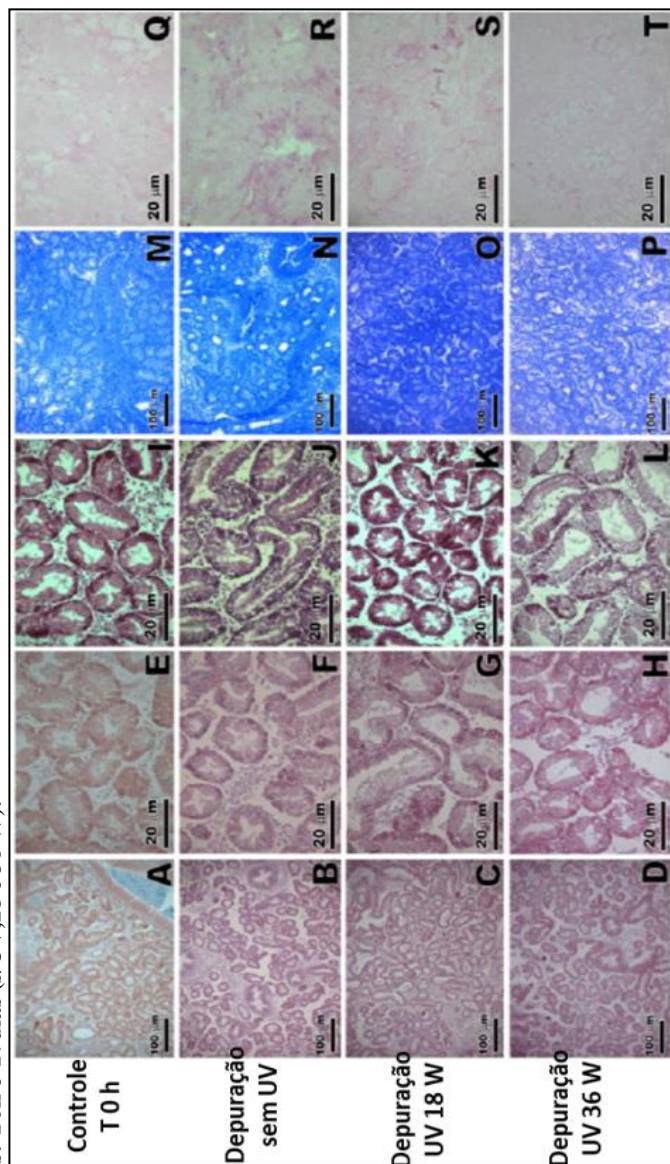
#### **5.1.4 Alterações teciduais nas ostras**

##### **5.1.4.1 Glândula Digestiva**

O estudo histológico dos TD das ostras mostrou que estes não apresentavam alterações tissulares e de composição química mesmo depois das ostras serem submetidas aos diferentes tratamentos de depuração. Assim como não foi observada perda parenquimal e o conteúdo proteico total e de açúcares neutros se mantiveram constantes (Figura 23).



**Figura 23-**Seções histológicas dos tecidos digestivos de *C. gigas*, submetidas à depuração por 7 dias. Técnicas de marcação utilizadas: A-H, Vanderbilt; I-L, Hematoxilina; M-P, Coomassie Brilliant Blue e Q-T, Periodic Acid Schiff. Amostras: T0h e T7dias (s/UV, 18 e 36 W).

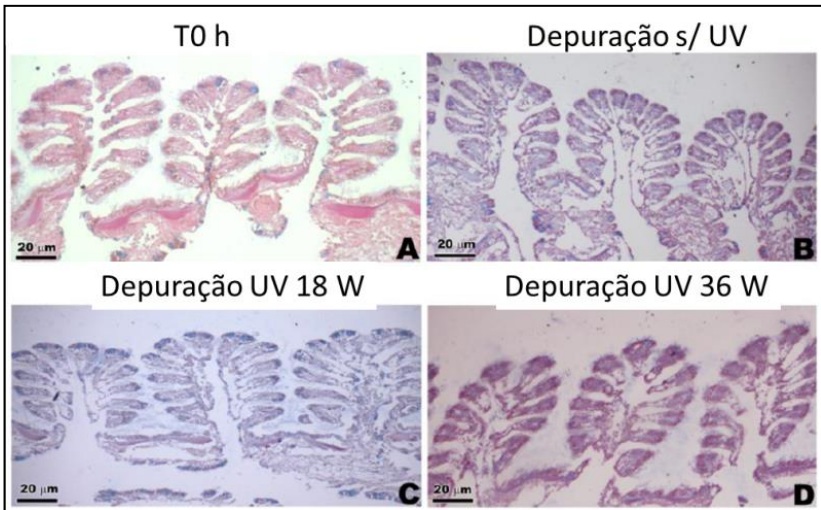


**Fonte:** Própria Autora

### 5.1.4.2 Brânquias

Não foram observadas alterações no nível parenquimal e estromal e o número de células mucosas neste órgão se manteve constante (Figura 24).

**Figura 24-**Secções de brânquias de *C. gigas*, submetidas à depuração por 7 dias. Técnicas de marcação: A-H, Vanderbilt; I-L, Hematoxilina; M-P, Coomassie Brilliant Blue; Q-T, Periodic Acid Schiff. Amostras: T0h e T7dias (s/UV, 18 e 36 W).



Fonte: Própria autora

Por razões de logística, não foi possível investigar os compostos orgânicos, protozoários e alterações teciduais nas ostras depuradas nos pontos de comércio de ostras vivas, somente a contaminação viral.

## 5.2 Discussão

A fragilidade apresentada pelas legislações que regem a produção e a comercialização dos moluscos bivalves contribuiu para a continuidade dos episódios, em humanos, de doenças associadas ao

consumo de moluscos bivalves. A fim de reduzir este risco, tem-se lançado mão de processos que aproveitam características fisiológicas alimentares dos bivalves, de filtradores, para a remoção das partículas acumuladas em seus tecidos (WHO 2010).

Em uma tese anterior (CORRÊA. et al. 2012), desenvolvida no LVA, foi testado outro modelo de depuradora, também com sistema fechado de recirculação de água, mas bem maior do que as depuradoras utilizadas neste projeto. Estes tanques de depuração, com capacidade de 1000 L de água e abrigando aproximadamente 200 dúzias de ostras, não era adequado às necessidades e limitações do pequeno comerciante de moluscos bivalves. Além disso, o equipamento contava com uma bomba dosadora de cloro, juntamente com o aparato UV, para a descontaminação dos animais. Frente à tendência da não utilização do cloro, pelos demais países, por ocasionar estresse nos animais e pela desvalorização comercial do produto (molusco), buscou-se simplificar o equipamento tornando-o mais compacto, de fácil manuseio e sem a adição do cloro.

Embora os sítios de alocação das ostras tenham sido os mesmos do Capítulo I deste estudo, devido às duas alocações não terem obedecido a um mesmo protocolo (a primeira foi simultânea nos quatro pontos e a segunda realizada em períodos diferentes, para cada ponto), seus resultados não puderam ser comparados estatisticamente.

Na segunda alocação realizada, apesar do *Cryptosporidium* não ter sido detectado no 14º dia de alocação, o protozoário *Giardia* foi encontrado, pelo segundo ano consecutivo, em amostras de BUC. Estudos relatam que este protista é um dos patógenos humanos mais frequentemente encontrado nas águas de recreação e de consumo humano (CRAUN et al. 2010; WILLIS et al. 2013). Uma vez que seus cistos são eliminados nas fezes em grandes quantidades pelos portadores (em torno de  $10^5$ /grama de fezes), aliado ao fato desses cistos serem muito resistentes à inativação durante os processos de tratamento de água e esgotos (BALDURSSON e KARANIS 2011; FRANCO et al. 2012). Estudos sugerem que os protocolos aplicados nas estações de tratamento de água e esgoto não são totalmente eficazes na remoção destes cistos, que por seus tamanhos reduzidos, não podem ser completamente removidos durante os processos físicos do tratamento (ROBERTSON et al. 2006). Além disso, os cistos são muito resistentes aos tratamentos químicos usualmente aplicados, como o cloro (FRANCO et al. 2012). ROBERTSON et al. (2006), em

estudo desenvolvido numa estação de tratamento de esgoto na Noruega, constatou que a *Giardia* era encontrada com maior frequência nas amostras de efluentes coletadas, quando comparada a outro protozoário, o *Cryptosporidium*. Desta forma, os cistos de *Giardia* podem contaminar o ambiente marinho e serem concentrados nos moluscos através da filtração, estando principalmente presentes nas brânquias destes animais, representando um grande risco potencial aos consumidores de moluscos, já que são necessários poucos cistos (até 10 cistos) para o início de uma infecção (FRANCO et al. 2012).

Conforme relatado no Capítulo I desta tese, as contaminações virais do ambiente marinho e das ostras têm sido repetidamente detectadas em estudos realizados em diversos locais, inclusive em Florianópolis. As temperaturas mais elevadas nos períodos das alocações podem ter prejudicado o achado de alguns vírus, como do NoV, que são mais prevalentes no inverno, quando a temperatura da água está mais baixa (MAALOUF et al. 2010b; THOMAS et al. 2011). A maior pluviosidade nos períodos da alocação, ao contrário do ocorrido na primeira alocação realizada, no Capítulo I desta tese, onde a média obtida para esse parâmetro foi de 2 mm, pode ter acarretado a diluição dos patógenos, sendo estes encontrados em menor diversidade. O HAdV continuou como o mais prevalente nas amostras, confirmando os resultados de outros trabalhos realizados pela equipe do LVA, durante alguns anos (RIGOTTO et al. 2010; MORESCO et al. 2012; SOUZA et al. 2012).

De maneira geral, a detecção dos compostos orgânicos nesta realocação foi menor em diversidade e concentração, quando comparadas aos resultados encontrados anteriormente neste trabalho. Embora a detecção de LABs nas ostras provenientes da segunda alocação no BUC, tenha sido aproximadamente a metade do valor encontrado nas ostras coletadas durante a primeira alocação no BUC, este valor ainda foi maior do que o encontrado em cada um dos outros dois pontos analisados, RIB e SAL. Este fato aponta para a continuidade de uma maior contaminação por esgoto doméstico no BUC, por dois anos consecutivos, já que este tipo de composto orgânico faz parte das formulações de detergentes. Embora RIB seja considerado o local mais limpo, dentre os 4 estudados, a concentração de  $\Sigma$ HPAs encontrado nas amostras superou a encontrada no BUC, o mais poluído. A predominância de HPAs de baixo peso molecular (leves) sobre os de alto peso molecular (pesados) é um indicativo de

introduções de derivados de petróleo. Estes podem ser introduzidos por embarcações ou por efluentes de esgoto doméstico ou industrial na região. A proximidade com o aeroporto Hercílio Luz, pode também ter facilitado a contaminação de RIB por combustíveis dos aviões e o maior índice pluviométrico (aproximadamente 3 vezes superior a média desse parâmetro para o BUC no período da coleta) pode ter contribuído para a contaminação desse ponto de alocação, através da lixiviação.

Por já ter sido realizado, previamente ao Capítulo II, testes de sobrevivência de *C. gigas* nos tanques de depuração BWA SC-2 (os mesmos utilizados no presente trabalho) com duração de 15 dias e, tendo o autor destes testes concluído que a mortalidade e a perda de peso, durante o ensaio, não eram significativa, prosseguiu-se com os ensaios de descontaminação das ostras, por depuração, relatado na presente tese (VOLPATO 2009).

Nos ensaios de depuração realizados nesta etapa observou-se que apesar do *Cryptosporidium* não ter sido encontrado nas amostras de ostras que permaneceram alocadas nos pontos por 14 dias, ele foi detectado nas ostras depuradas do BUC (com UV 18 W). Este protozoário tem sido considerado um dos principais contaminantes biológicos da água (BALDURSSON e KARANIS 2011; FRANCO et al. 2012), em parte devido à dificuldade de sua remoção ou inativação nas estações de tratamento de esgoto (FRANCO et al. 2012) e vários surtos de criptosporidiose, associados ao consumo de moluscos bivalves, já foram relatados (POTASMAN et al. 2002). Além da detecção de *Giardia* em amostra coletada no 14º dia de alocação das ostras no BUC, seus cistos também foram detectados nas amostras de ostras depuradas de RIB e SAL. Os diferentes tratamentos aplicados nos ensaios de depuração, não foram efetivos na eliminação dos (oo)cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia*, já que foram encontrados nos 3 tratamentos aplicados neste processo. Estudos que atestem a viabilidade destes (oo)cistos seriam necessários para que se avalie o potencial infeccioso destas amostras. Segundo a USEPA (2006) a dose de UV necessária para a inativação desses protozoários é de 12 mJ/cm<sup>2</sup>, menor do que as utilizadas neste ensaio (mínimas de 16 e 44 mJ/cm<sup>2</sup>).

Segundo o critério estabelecido por BAUMARD et al. (1998) para as concentrações de HPAs em ostras, todas as amostras controle (T0 h de depuração) e também as provenientes das depurações com

UV, apresentaram concentrações de HPAs que caracterizariam grau de poluição mais elevado (acima de  $100 \text{ ng g}^{-1}$ ).

Somente BUC, apresentou valores de LABs mais elevados (acima de  $100 \text{ ng g}^{-1}$ ), o que segundo BENOLIEL (1986) são valores compatíveis aos locais de média poluição.

Mesmo considerando a menor quantidade bioacumulada dos dois vírus-modelo pelas ostras dos 4 pontos estudados (MNV-1 no RIB), este valor possibilitaria a avaliação da redução dos 4 log (99,99%) durante a depuração. A maior detecção de HAdV nas ostras bioacumuladas artificialmente com HAdV2 pode ter sido uma soma das contaminações naturais (sofridas nos 4 pontos de alocação) e artificiais (nos aquários). Pela alta prevalência dos HAdV nas regiões costeiras de Florianópolis (RIGOTTO et al., 2010; PILOTTO, 2011; MORESCO et al., 2012), as ostras alocadas nos 4 pontos já estavam contaminadas com estes vírus, previamente aos ensaios de bioacumulação no LVA.

Os genomas dos dois vírus estudados apresentaram comportamentos distintos diante dos processos de depuração. O HAdV se mostrou muito resistente ao processo, sendo detectado até o final dos ensaios (7 dias). A depuração do HAdV se comportou de maneira diferente quando comparamos os pontos mais limpos (RIB e SAL) com os mais contaminados (TAP e BUC), havendo um aumento de log (de 1 a 3,5) nos primeiros e uma redução (de 1 a 2) nos dois últimos pontos. Esta diferença não pode ser associada à quantidade de HAdV bioacumulada nas contaminações artificiais dos moluscos, pois mesmo em SAL onde ocorreu a menor bioacumulação artificial deste vírus ( $10^5 \text{ GC g}^{-1}$ ) houve uma elevada detecção ao final dos 7 dias. A maior diversidade de partículas bioacumuladas naturalmente nos pontos mais contaminados (TAP e BUC) podem ter favorecido a agregação e precipitação desses vírus (ou genomas nus) ao saírem das ostras, durante a depuração, impedindo que ficassem ressuspensos na água, retornando aos tecidos dos animais. CORRÊA. et al. (2012), em avaliação da cinética de HAdV5, por PCR, em ostras também artificialmente contaminadas, constatou que o genoma desse vírus podia ser detectado até 4 dias de depuração, enquanto que o genoma do HAV só foi detectado até 3 dias do ensaio (com UV 18 W). Mesmo tendo aumentado o tempo de duração do ensaio de depuração e a dose de UV a que esse vírus foi exposto, ele se mostrou mais resistente do que o MNV-1, um vírus de genoma RNA como o HAV

utilizado pela autora citada. Existem diversos relatos sobre a maior resistência dos adenovírus à radiação UV (KO et al. 2005; EISCHEID e LINDEN 2011), mas também se sabe que os danos causados pela radiação UV são cumulativos (UPADHYAYA et al. 2004), o que aumentaria a chance da inativação viral com o passar do tempo de depuração. EISCHEID e LINDEN (2011), em um estudo comparativo dos danos ocasionados nos adenovírus, pela exposição às lâmpadas UV de baixa (monocromática) ou de média (policromática) pressão, constataram que mesmo quando utilizada UV monocromática além da produção de danos no DNA viral, já esperado, são danificadas proteínas do capsídeo viral, como as proteínas IIIa envolvidas na manutenção do formato icosaédrico deste capsídeo. As lâmpadas UV utilizadas no presente experimento de depuração eram monocromáticas como no estudo relatado pelos autores citados e durante os 7 dias, o vírus poderia ser exposto diversas vezes à radiação emitida por essas lâmpadas.

O comportamento do HAdV, durante as depurações, vindo da contaminação natural advinda dos 4 pontos e com coletas de 12 ostras/tempo/ponto, seguiu a cinética mostrada pelos controles-positivos para HAdV (as ostras bioacumuladas em aquário). Embora o número de ostras analisadas nos tempos de coleta (0, 4 e 7 dias de depuração) tenham sido diferentes para os dois grupos avaliados, ou seja, artificialmente (n=3) e as naturalmente contaminadas (n=12), o comportamento destes vírus nas depurações dos pontos mais limpos e mais contaminados teve uma cinética semelhante a dos controles-positivos virais. Não se avaliou HAV, HuNoV GI/GII e JCPyV durante as depurações por estes não terem sido encontrados nas análises feitas nos T0h das depurações dos pontos.

Embora os HAdV tenham sido detectados nas amostras de ostras que permaneceram por 14 dias nos pontos estudados e em uma amostras depurada por 4 dias, no restaurante, não foram detectados HAdV infecciosos nestas amostras. Os estresses do ambiente marinho podem ter sido suficientes na inativação destes vírus. Também é possível que as amostras tenham sido contaminadas, já com partículas virais defectivas ou somente com o genoma viral.

A falta do *chiller* nas depuradoras disponibilizadas nos restaurantes ocasionou diversas interrupções nestas depurações, com a desova e morte dos animais. As depuradoras nos pontos de comércio tiveram uma ótima aceitação por parte dos funcionários dos

estabelecimentos e também pelos clientes. Os funcionários puderam manejar com destreza o equipamento e os laudos das análises virológicas das amostras foram entregues aos proprietários dos estabelecimentos, que os disponibilizaram aos seus clientes.

Os resultados deste capítulo foram publicados no *International Journal of Food Microbiology*, no ano de 2013 e o artigo se encontra disponível no Apêndice D desta tese.

## **6 Conclusão geral**

### **6.1 A contaminação ambiental**

Medidas sistemáticas, que reduzam a contaminação das águas nos ambientes costeiros em Florianópolis são essenciais para a manutenção da boa qualidade sanitária dos moluscos bivalves produzidos nas proximidades do município. Por dois anos consecutivos de análise de amostras, coletadas nas baías Sul e Norte, da Grande Florianópolis, contaminações diversas foram detectadas. Pela proximidade entre os locais estudados e os demais pontos de cultivo, existe um grande risco de contaminação dos bivalves produzidos.

Os resultados registrados no Capítulo I da tese reforçam os achados de outros grupos de pesquisa, quanto à ausência de correlação entre contaminação bacteriana da água com presença de vírus ou de protozoários, na água ou nas ostras; como também confirmam a alta prevalência dos HAdV em amostras ambientais e nos locais estudados. A prevalência deste vírus, por dois anos consecutivos de coleta amostral, além dos protozoários também encontrados nas amostras, apontam para uma contaminação por esgoto, principalmente no estuário do Rio Bücheler (BUC).

Embora pesticidas organoclorados, como os DDTs, tenham sua venda proibida há mais de 20 anos, eles foram detectados no sedimento marinho, inclusive nos locais de cultivo de ostras e sementes de ostras, fato que expõe estes animais e aqueles que os consomem à contaminação por estas substâncias.

Nas análises realizadas no Capítulo II, a contaminação por compostos orgânicos foi menor do que a encontrada no ano anterior (Capítulo I), continuando BUC o mais impactado pela urbanização, com a concentração de LABs mais elevada.



São necessários estudos mais aprofundados que assegurem que outros fatores locais, como a proximidade ao aeroporto Hercílio Luz, além do alto índice pluviométrico no período da coleta, não estejam contribuindo para a elevação dos HPAs em RIB, que é considerado o local mais limpo, dentre os incluídos nesta tese. Considerando-se a importância dos cultivos presentes nesta localidade, para a produção nacional de moluscos bivalves, são requeridas atitudes urgentes de contenção de contaminações e de maior vigilância na produção desses animais.

## **6.2** *Ensaio de depuração*

Ao contrário do que se esperava, não houve diferenças dentre os tratamentos de UV aplicados nas depurações e o decaimento viral (GC) nas ostras durante os 7 dias de depuração. Também não era esperado que este decaimento fosse mais rápido nas amostras com maior quantidade e diversidade de contaminações, como as de BUC. Os testes com as depuradoras confirmaram a maior resistência dos HAdV ao tratamento com UV, mas os resultados com MNV-1 foram animadores. A presença dos protozoários estudados foi observada até o final dos ensaios, porém há necessidade da realização de ensaios que acessem a infeciosidade viral e dos protozoários submetidos às depurações, para obtermos conclusões mais precisas sobre o assunto.

A inserção das depuradoras nos restaurantes foi muito bem aceita, mas há necessidade da utilização de *chiller*, acoplado ao equipamento, para minimizar o estresse dos animais e desovas, provocadas pelo aumento da temperatura da água nos meses mais quentes, é essencial. A ausência de filtros de areia nos tanques de depuração favoreceu ao aumento de sedimentos nas depuradoras. Há necessidade de avaliar se a inserção dos filtros nas depuradoras auxiliaria na redução da sedimentação das partículas nos tanques e na turbidez da água utilizada; já que nos estabelecimentos comerciais em que os tanques foram alocados, não há disponibilidade de água do mar filtrada, como nos experimentos controlados, realizados no LVA. A depuradora teve bom desempenho na descontaminação das ostras dos restaurantes, naturalmente contaminadas com HAdV. Em 50 amostras analisadas, após a depuração, somente em uma amostra o HAdV foi detectado, mas não estava infeccioso. Embora o HAdV seja prevalente

nos locais de cultivo utilizados pelos comerciantes de moluscos bivalves, participantes desta etapa do trabalho, sua detecção foi abaixo da esperada, nas ostras depuradas por 4 dias. Isso pode indicar que nas amostras naturalmente contaminadas, ou com menor concentração de contaminação, o protocolo de depuração aplicado (UV de 36 W, por 4 dias), seria suficiente na eliminação desta contaminação. Porém, seria necessário que em testes futuros, se avaliasse ostras naturalmente contaminadas, antes e após a depuração.

## 7 Outras considerações

As legislações relacionadas à produção e comercialização dos bivalves não abraçam todos os riscos apresentados pelos diversos microrganismos, pois elas só regulamentam quantidades de bactérias, na água de cultivo ou na carne dos moluscos, deixando fora os microrganismos mais resistentes, como protozoários e vírus.

A ausência de dados epidemiológicos das gastroenterites virais no Brasil, principalmente daquelas ocasionadas pelo consumo de moluscos bivalves contaminados, acarreta uma sensação equivocada de que o risco da ocorrência de tais episódios é raro, ou inexistente. Assegurar a qualidade sanitária do molusco bivalve, baseado nos parâmetros de *E. coli*, presentes na água ou no molusco, é inadequado.

A busca por métodos mais eficientes na descontaminação dos bivalves produzidos, como a transposição ou a depuração dos animais, também auxiliaria na redução do risco de veiculação de doenças aos humanos. A depuração dos bivalves, ainda esbarram em grandes desafios que precisam ser ultrapassados, como o da eliminação dos vírus entéricos dos tecidos das ostras *C. gigas*. Estudos que contribuam nessa direção, ou seja, na remoção de patógenos virais, são escassos e há necessidade de maior conhecimento sobre as interações vírus entéricos-moluscos bivalves. Outra alternativa, para a redução do risco de doenças (gastroenterite, hepatite A, etc), seria o cozimento prolongado dos animais, previamente ao consumo. Sabe-se que práticas de consumos de bivalves crus ou levemente cozidos, em receitas culinárias, como a utilizada no teste de inativação térmica do RV, descrito no Apêndice A desta tese, não eliminam o riscos de aquisição de doenças, devido à maior resistência dos protozoários e vírus entéricos ao calor, quando alojados nos tecidos dos bivalves. Anualmente, diversas pesquisas, associando essas práticas de

consumo moluscos, aos surtos de gastroenterites e hepatites virais entéricas têm sido mundialmente publicadas.

Também há necessidade de um maior entendimento da relação entre os patógenos entéricos virais e as partículas em suspensão, nos ambientes aquáticos, o que poderia auxiliar no melhoramento da eficiência dos protocolos utilizados nas estações de tratamento de esgoto, na eliminação deles. Impedindo por exemplo, que os NoV GI, maiores responsáveis por gastroenterites virais associadas ao consumo de ostras, retornassem ao meio marinho, contaminando os locais de cultivo dos bivalves.

### Referências

- AHSAN, N. and K. V. SHAH (2002). Polyomaviruses: an overview. **Graft** 5(9): 9-18.
- ALBARNAZ, J. D., J. TOSO, A. A. CORRÊA, et al. (2007). Relationship between the contamination of gulls (*Larus dominicanus*) and oysters (*Crassostrea gigas*) with *Salmonella* serovar Typhimurium by PCR-RFLP. **International Journal of Environmental Health Research** 17(2): 1-8.
- ALBINANA-GIMENEZ, N., P. CLEMENTE-CASARES, B. CALGUA, et al. (2009a). Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. **Journal of Virological Methods** 158 104–109.
- ALBINANA-GIMENEZ, N., M. P. MIAGOSTOVICH, B. CALGUA, et al. (2009b). Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. **Water Research** 43: 2011-2019.
- ALMEIDA, A., Â. CUNHA, S. FERNANDES, et al. (2007a). Copper effects on bacterial activity of estuarine silty sediments. **Estuarine, Coastal and Shelf Science** 73(3-4): 743–752.
- ALMEIDA, F. V., A. J. CENTENO, M. C. BISINOTI, et al. (2007b). Substâncias Tóxicas Persistentes (STP) no Brasil. **Química Nova** 30(8): 1976-1985.
- ANDERSON, K. L., J. E. WHITLOCK and V. J. HARWOOD (2005). Persistence and Differential Survival of Fecal Indicator Bacteria in Subtropical Waters and Sediments. **Applied and Environmental Microbiology** 71(6).
- ANJOS, K. D. (2013). Análise do genoma completo de um isolado de Sapovirus no Distrito Federal e expressão do capsídeo do vírus para a produção de "Virus-like particles" pelo sistema de baculovírus recombinantes. **Mestrado**, UnB.
- ATMAR, R. L. (2010). Noroviruses – State of the Art. **Food and Environmental Virology** 2(3): 117-126.

- BAE, J. and K. J. SCHWAB (2008). Evaluation of Murine Norovirus, Feline Calicivirus, Poliovirus, and MS2 as surrogates for Human Norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. **Applied and Environmental Microbiology** 74(2): 477-484.
- BAERT, L., C. E. WOBUS, E. V. COILLIE, et al. (2008). Detection of Murine Norovirus 1 by using Plaque Assay, Transfection Assay, and Real-Time Reverse Transcription-PCR before and after heat exposure. **Applied and Environmental Microbiology** 74(2): 543-546.
- BAGORDO, F., T. GRASSI, A. IDOLO, et al. (2013). Rotavirus occurrence in shellfish with low levels of *E. coli*. **Food and Environmental Virology** 5: 169-175.
- BALDURSSON, S. and P. KARANIS (2011). Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. **Water Research** 45: 6603-6614.
- BARARDI, C. R. M., H. YIP, K. R. EMSLIE, et al. (1998). Flow cytometry and RT-PCR for rotavirus detection in artificially seeded oyster meat. **International Journal of Food and Microbiology** 49: 9-18.
- BARILLÉ, L., J. PROU, M. HÉRAL, et al. (1997). Effects of high natural seston concentrations on the feeding, selection, and absorption of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 212: 149-172.
- BARNABE, G. (1996). Bases biológicas y ecológicas de la acuicultura. **Zaragoza**, Acribia Editorial.
- BAUMARD, P., H. BUDZINSKY and P. GARRIGUES (1998). Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments and mussels (*Mytilus edulis*) from the Western Mediterranean Sea. **Environmental Toxicology and Chemistry** 17: 765-776.
- BEECHAM, J. (2008). A Literature review on particle assimilation by molluscs and crustaceans. Cefas Environment Report UK, CEFAS.
- BEIGUELMAN, B. (2003). Os Sistemas Sanguíneos Eritrocitários. **Ribeirão Preto, SP**.
- BENOLIEL, M. J. (1986). Pesticidas organoclorados e

poliolorobifenis em mexilhão na Costa Portuguesa – “Mussel Watch”. **Anais do Instituto Hidrográfico de Lisboa** 7: 75-77.

BERK, A. J. (2007). Adenoviridae: The viruses and their replication. *Fields Virology*. D. M. H. Knipe, Peter M. **Philadelphia** Lippincott Williams & Wilkins. 2.

BERTRAND, I., J. F. SCHIJVEN, G. SÁNCHEZ, et al. (2012). The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. **Journal of Applied Microbiology** 112(6): 1059-1074.

BOFILL-MAS, S., M. FORMIGA-CRUZ, P. CLEMENTE-CASARES, et al. (2001). Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA. **Journal of Virology** 75(21): 10290-10299.

BOFILL-MAS, S., S. PINA and R. GIRONES (2000). Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. **Applied and Environmental Microbiology** 66(1): 238-245.

BOLONG, N., A. F. ISMAIL, M. R. SALIM, et al. (2009). A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. **Desalination** 239(1-3): 229-246.

BOOTHUPUR, R. and D. BRENNAN (2010). Human polyoma viruses and disease with emphasis on clinical BK and JC. **Journal of Clinical Virology** 47(4): 306-312.

BOULTER, M. and P. WILSON (1998). The use physiological assessment techniques for determining the relative activity rates of bivalve shellfish during simulated depuration. **Journal Shellfish Research** 17: 1627-1631.

BRASIL (2001). Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Resolução RDC n.12, de 02 de janeiro de 2001. Ministério da Saúde: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Diário Oficial da União. ANVISA, D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 10 de janeiro de 2001.

BRASIL (2005). RESOLUÇÃO No 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e

diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. CONAMA, Diário Oficial da União 357/2005: 58-63.

BRASIL (2011). Portaria Nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. MS, DOU. 2914.

BRASIL (2012a). Instrução Normativa Interministerial Nº 7, de 8 de maio de 2012-Institui o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB), estabelece os procedimentos para a sua execução e dá outras providências. MPA, DOU: 55-59.

BRASIL (2012b). Portaria nº 204 de 28 de junho de 2012. M. d. P. e. Aquicultura, MPA.

BROMAN, M., S. JOKINEN, M. KUUSI, et al. (2010) Epidemiology of Hepatitis A in Finland in 1990–2007 **Journal of Medical Virology** 82, 934–941 DOI: 10.1002/jmv.21759.

BURRI, S. and P. VALE (2006). Contaminação de bivalves por DSP: risco de episódios de gastroenterites numa região de toxicidade endêmica. **Revista Portuguesa de Saúde Pública** 24(1): 115-124.

BUTT, A. A., K. E. ALDRIDGE and C. V. SANDERS (2004). Infections related to the ingestion of seafood Part I: Viral and bacterial infections. **The Lancet Infectious Diseases** 4(4): 201-212.

CABALLERO, S., F. X. ABAD, F. Loisy, et al. (2004). Rotavirus Virus-Like Particles as surrogates in environmental persistence and inactivation studies. **Applied and Environmental Microbiology** 70(7): 3904-3909.

CALGUA, B., C. R. M. BARARDI, S. BOFILL-MAS, et al. (2011). Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. **Journal of Virological Methods** 171: 1-7.

CALGUA, B. M. A., A. GRÜNERT, S. BOFILL-MAR, et al. (2008). Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples.

**Journal of Virological Methods** 153: 79-83.

CARLOS, E. A., A. A. NEVES, C. REIS, et al. (2011).

Determinação simultânea de trihalometanos e agrotóxicos em água por cromatografia gasosa. **Química Nova** 34(2): 272-278.

CDC (2011). Surveillance for waterborne disease outbreaks and other health events associated with recreational water — United States, 2007–2008 and Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water — United States, 2007–2008. Surveillance Summaries. MMWR, US Department of Health and Human Services. 60: 80.

CHAN, P. A., S. E. WAKEMAN, T. FLANIGAN, et al.

(2008). Case report: HIV-2 diagnosis and quantification in high-risk patients. **AIDS Research and Therapy** 5(18): 1-5.

CHIBA, S., S. NAKATA, K. NUMATA-KINOSHITA, et al.

(2000). Sapporo virus: history and recent findings. **The Journal of Infectious Diseases** 181: 303-308.

CHOI, J. M., A. M. HUTSON, M. K. ESTES, et al. (2008).

Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 105: 9175-9180.

CHRISTO, S. W. (2006). Biologia reprodutiva e ecologia de ostras do gênero *Crassostrea* sacco, 1897 na Baía de Guaratuba (Paraná – Brasil): um subsídio ao cultivo.

**Doutorado**, Universidade Federal do Paraná.

COELHO, C., C. E. B. VINATEA, A. P. HEINERT, et al.

(2003). Comparison between specific and multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction for detection of hepatitis A virus, poliovirus and rotavirus in experimentally seeded oysters. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 98(4): 465-468.

COELHO, D. (2013). Apenas 12% da população de SC é atendida por rede esgoto, diz CASAN. G1 Santa Catarina. [g1.globo.com](http://g1.globo.com).

COGNIE, B., L. BARILLÉ, G. MASSÉ, et al. (2003).

Selection and processing of large suspended algae in the oyster *Crassostrea gigas*. **Marine Ecology Progress Series** 250: 145-152.

CORRÊA, A. A., D. S. M. SOUZA, V. MORESCO, et al.



(2012). Stability of human enteric viruses in seawater samples from mollusc depuration tanks coupled with ultraviolet irradiation. **Journal of Applied Microbiology** 113(06): 1554-1563.

CORRÊA, A. d. A., J. D. ALBARNAZ, V. MORESCO, et al. (2007). Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Marine Environmental Research** 63: 479-489.

CORRÊA., A. A., C. RIGOTTO, V. MORESCO, et al. (2012). The depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated with hepatitis A virus and human adenovirus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 107: 11-17.

CRAUN, G. F., J. M. BRUNKARD, J. S. YODER, et al. (2010). Causes of Outbreaks Associated with Drinking Water in the United States from 1971 to 2006. **Clinical Microbiological Reviews** 23(3): 507-528.

CROMEANS, T. L., X. LU, D. D. ERDMAN, et al. (2008). Development of plaque assay for adenoviruses 40 and 41. **Journal of Virological Methods** 151: 140-145.

D'AQUINO, C. A., C. A. F. SCHETTINI and C. E. V. CARVALHO (2006). Dinâmica de sedimentos finos em zonas de cultivo de moluscos marinhos. **Atlântica, Rio Grande** 28(2): 103-116.

DALIANIS, T., T. RAMQVIST, K. ANDREASSON, et al. (2009). KI, WU and Merkel Cell Polyomaviruses: A new era for human Polyomavirus research. **Seminars in Cancer Biology** 19(4): 270-275.

DOERRIES, K. (2006). Human Polyomavirus JC and BK persistent infection. Polyomaviruses and human diseases. N. Ahsan, Eureka.com and Springer Science+Business Media.: 102-116.

DOMINGUES, J. T., F. D. PARIS and V. M. SCHMITT (2007). Proposta de reação em cadeia da polimerase (PCR) semi-nested para pesquisa e diferenciação dos vírus BK e JC. **Scientia Medica** 17(2): 72-78.

DONALDSON, E. F., L. C. LINDESMITH, A. D. LoBue, et al. (2010). Viral shape-shifting: norovirus evasion of the

- human immune system. **Nature Reviews Microbiology** 8: 231-241.
- DONNEMBERG, M. (2010). Infections due to *Escherichia coli* and other enteric Gram-negative bacilli. **ACP Medicine**: 1-10.
- EC (2004a). Corrigendum to Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. EC 853/2004. T. E. P. a. t. C. t. E. Union, Official Journal of the European Union.
- EC (2004b). Regulation (EC) N° 854/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption, Official Journal of the European Union. L 226: 83–127
- EISCHEID, A. C. and K. G. LINDEN (2011). Molecular indications of protein damage in Adenoviruses after UV disinfection. **Applied and Environmental Microbiology** 77(03): 1145–1147.
- ESPINOSA, P., E. L. BARILLÉ and B. B. ALLAM (2007). Use of encapsulated live microalgae to investigate pre-ingestive selection in the oyster *Crassostrea gigas*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 343: 118-126.
- FAO (2013). FAO Fisheries and Aquaculture Department has published the Global Aquaculture Production Statistics for the year 2011. Fisheries and Aquaculture Department. e-Bulletin, Food and Drug Organization.
- FARIAS, H. (2008). Qualidade higiênico-sanitária na cadeia produtiva de ostras, *Crassostrea* sp., cultivadas na Baía de Guaratuba, PR, Brasil. **Mestrado**, Universidade Federal do Paraná.
- FERREIRA, J. F. and F. M. D. O. NETO (2006). Cultivo de moluscos em Santa Catarina. SC, Brasil, UFSC.
- FONTENELE, E. G. P., M. R. A. MARTINS, A. R. P. QUIDUTE, et al. (2010). Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia (ABE&M)** 54(1): 6-16.
- FRANCO, R. M. B., N. BRANCO and D. A. G. LEAL

- (2012). Parasitologia ambiental: métodos de concentração e detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água. **Revista de Patologia Tropical** 41(2): 119-135.
- FRETZ, R., D. SCHMID, S. Jelovcan, et al. (2009). An outbreak of norovirus gastroenteritis in an Austrian hospital, winter 2006–2007. **Wien Klin Wochenschr** 121: 137–143.
- GABUTTI, G., A. D. DONNO, F. BAGORDO, et al. (2000). Comparative Survival of Faecal and Human Contaminants and Use of Staphylococcus aureus as an Effective Indicator of Human Pollution **Marine Pollution Bulletin** 40(8): 697-700.
- GARCIA, L. M., C. PORTE and J. ALBAIGÉS (2000). Organochlorinated pollutants and xenobiotic metabolizing enzymes in W. Mediterranean Mesopelagic Fish. **Marine Pollution Bulletin** 40(9): 764-768.
- GARRAFA, P. (2009). Avaliação da qualidade virológica do efluente doméstico tratado e disponibilizado para reúso na cidade de São Paulo. **Tese de doutorado**, USP.
- GENTRY, J., J. VINJÉ and E. K. LIPP (2009). A rapid and efficient method for quantitation of genogroups I and II norovirus from oysters and application in other complex environmental samples. **Journal of Virological Methods** 156: 59-65.
- GÓMEZ-COUSO, H., F. FREIRE-SANTOS, G. A. Hernández-Córdova, et al. (2005). A histological study of the transit of *Cryptosporidium parvum* oocysts through clams (*Tapes decussatus*). **International Journal of Food Microbiology** 102(1): 57-62.
- GONZALEZ-OREJA, J. A. and J. I. SAIZ-SALINAS (1998). Short-term spatio-temporal changes in urban pollution by means of faecal sterols analysis. **Marine Pollution Bulletin** 36: 868-875.
- GREEN, G. and P. D. NICHOLS (1995). Hydrocarbons and sterols in marine sediments and soils at Davis Station, Antarctica: a survey for human-derived contaminants. **Antarctic Science** 7(2): 137-144.
- GRIFFIN, D. W., K. A. DONALDSON, J. H. PAUL, et al. (2003). Pathogenic human viruses in coastal waters. **Clinical Microbiology Reviews** 16(1): 129-143.

- HANSMAN, G. S., K. NATORI, T. OKA, et al. (2004). Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. **Archives of Virology** 150: 21-36.
- HANSMAN, G. S., T. OKA, R. OKAMOTO, et al. (2007) Human Sapovirus in Clams, Japan **Emerging Infectious Diseases** 13, 620-622.
- HARAMOTO, E., H. KATAYAMA, K. OGUMA, et al. (2006). Seasonal profiles of human noroviruses and indicator bacteria in a wastewater treatment plant in Tokyo, Japan. **Water Science and Technology** 54(11-12): 301-308.
- HERNROTH, B. E., A. C. CONDÉN-HANSSON, A. S. REHNSTAM-HOLM, et al. (2002). Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. **Applied and Environmental Microbiology** 68(9): 4523-4533.
- HEWITT, J., G. E. GREENING, M. LEONARD, et al. (2013). Evaluation of human adenovirus and human polyomavirus as indicators of human sewage contamination in the aquatic environment. **Water Research** 47(17): 6750–6761.
- HOLLINGER, F. B. and S. U. EMERSON (2007). Hepatitis A Virus. *Fields Virology*. D. M. H. Knipe, Peter M., Lippincott Williams & Wilkins. 1.
- HU, L., S. E. CRAWFORD, R. CZAKO, et al. (2012). Cell attachment protein VP8\* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. **Nature** 485: 256-260.
- IBGE (2011). Censo demográfico 2010. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- ICTV (2012). Virus Taxonomy, Virology Division- International Union of Microbiological Societies.
- IFREMER. (2012, 09/07/2012). Production d' Ostréidés. **Aquaculture** Retrieved 22/01/2014, 2014, from <http://aquaculture.ifremer.fr/Statistiques-mondiales/Stats-conchyliculture/>
- Production-par-famille/Ostreides.
- JOTHIKUMAR, N., T. L. CROMEANS, M. D. SOBSEY, et al. (2005). Development and evaluation of a broadly reactive

- TaqMan Assay for rapid detection of Hepatitis A Virus. **Applied and Environmental Microbiology** 71(6): 3359-3363.
- KAGEYAMA, T., S. KOJIMA, M. SHINOHARA, et al. (2003). Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR. **Journal of Clinical Microbiology** 41(4).
- KARANIS, P., C. KOURENTI and H. Smith (2007). Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and Health** 05(1): 1-38.
- KINGSLEY, D. H. and G. P. RICHARDS (2003). Persistence of hepatitis A virus within oysters. **Journal of Food Protection** 66(02): 331-334.
- KO, G., T. L. CROMEANS and M. D. SOBSEY (2005). UV inactivation of adenovirus type 41 measured by cell culture mRNA RT-PCR. **Water Research** 39: 3643–3649.
- KOWALSKA, M., H. GÜLER and D. L. COCKE (1994). Interactions of clay minerals with organic pollutants. **The Science of The Total Environment** 141: 223-240.
- KUBICKI, J. D. and S. E. APITZ (1999). Models of natural organic matter and interactions with organic contaminants **Organic Geochemistry** 30: 911-927.
- LAW, R. J. and J. L. BISCAYA (1994). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) – Problems and progress in sampling, analysis and interpretation. **Marine Pollution Bulletin** 29(4-5): 235-241.
- LE BLANC, L. A., J. S. LATIMER, E. J. T., et al. (1992). The geochemistry of coprostanol in waters and surface sediments from Narragansett Bay. **Estuarine, Coastal and Shelf Science** 34: 439-458.
- LE GUYADER, F. S., R. L. ATMAR and J. L. PENDU (2012). Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play. **Current Opinion in Virology** 2: 103-110.
- LE GUYADER, F. S., J.-C. LE SAUX, K. AMBERT-BALAY, et al. (2008). Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a

- french oyster-related gastroenteritis outbreak. **Journal of Clinical Microbiology** 46(12): 4011-4017.
- LE GUYADER, F. S., F. LOISY, R. L. ATMAR, et al. (2006). Norwalk Virus-specific binding to oyster digestive tissues. **Emerging Infectious Diseases** 12(06): 931-936.
- LEAL, D. A. G. and R. M. B. FRANCO (2008). Moluscos bivalves destinados ao consumo humano como vetores de protozoários patogênicos: Metodologias de detecção e normas de controle. **Revista Panamericana de Infectologia** 10(4): 48-57.
- LEAL, D. A. G., A. P. D. RAMOS, D. S. M. SOUZA, et al. (2013). Sanitary quality of edible bivalve mollusks in Southeastern Brazil using an U.V based depuration system. **Ocean & Coastal Management** 72: 93-100.
- LEE, R., A. LOVATELLI and L. ABABOUCH (2008) Bivalve depuration: fundamental and practical aspects **FAO Fisheries Technical Paper** 511, 161.
- LENOCH, R. (2003) Saúde pública e os moluscos marinhos cultivados **Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária** 28-29, 65-70.
- LEWIS, G. D. and T. G. METCALF (1988). Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. **Applied and Environmental Microbiology** 54(8): 1983-1988.
- LOISY, F., R. L. ATMAR, J.-C. L. SAUX, et al. (2005). Use of Rotavirus Virus-Like Particles as surrogates to evaluate virus persistence in shellfish. **Applied and Environmental Microbiology** 71(10): 6049-6053.
- LÓPEZ-BAREA, J. and C. PUEYO (1998). Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis** 13: 3-15.
- LÓPEZ-GARCIA, E., A. M. HARO-PÉREZ, I. Hernández-García, et al. (2010). Epidemiología de una serie de casos de hepatitis A en la provincia de Salamanca. **Vacunas** 11(4): 140-142.
- MAALOUF, H. (2010). Spécificité de la fixation des

- norovirus sur les tissus de coquillages et implications sanitaires. **Thèse de Doctorat**, Université de Nantes.
- MAALOUF, H., M. POMMEPUY and F. S. L. GUYADER (2010a). Environmental Conditions Leading to Shellfish Contamination and Related Outbreaks. **Food and Environmental Virology** 2(3): 136-145.
- MAALOUF, H., J. SCHAEFFER, S. PARNAUDEAU, et al. (2011). Strain-dependent norovirus bioaccumulation in oysters. **Applied and Environmental Microbiology** 77(10): 3189-3196.
- MAALOUF, H., M. ZAKHOUR, J. L. PENDU, et al. (2010b). Distribution in tissue and seasonal variation of Norovirus genogroup I and II ligands in oysters. **Applied and Environmental Microbiology** 76(16).
- MACLEOD, W. D., D. W. BROWN, A. J. FRIEDMAN, et al. (1985-1986). Standard Analytical Procedures of the NOAA National Analytical Facility. Extractable Toxic Organic Components., U. S. Department of Commerce: 92, 121
- MALUF, J. C. C. (2009). Estudo dos metais traço (zinco, cádmio e chumbo) em duas regiões do complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape (SP) sob diferentes pressões antrópicas. **Mestrado**, USP.
- MARTINS, C. C., J. A. FERREIRA, S. TANIGUCHI, et al. (2008). Spatial distribution of sedimentary linear alkylbenzenes and faecal steroids of Santos Bay and adjoining continental shelf, SW Atlantic, Brazil: Origin and fate of sewage contamination in the shallow coastal environment. **Marine Pollution Bulletin** 56: 1353–1376.
- MATOS, M. A. C. (2002). Resíduos de pesticidas organoclorados e bifenilos policlorados em sedimentos e algas de Santos e Cananéia, SP. Brasil. **Tese de Doutorado**, USP.
- MATTHIJNSSENS, J., M. CIARLET, S. M. MCDONALD, et al. (2011). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Archives of Virology** 156: 1397-1413.
- MCLEOD, C., B. HAY, C. GRANT, et al. (2009). Localization of norovirus and poliovirus in Pacific oysters.

- Journal of Applied Microbiology** 106: 1220-1230.
- MCQUAIG, S. M., T. M. SCOTT, J. O. LUKASIK, et al. (2009). Quantification of human polyomaviruses JC virus and BK virus by TaqMan quantitative PCR and comparison to other water quality indicators in water and fecal samples.
- MENA, K. D. and C. P. GERBA (2008). Waterborne Adenovirus. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology** 198: 133-167.
- MITRA, S., J. BARTEL and A. K. VOLETY (2011). Trace organic contaminants (PAHS, PCBs, and pesticides) in oysters *Crassostrea virginica*, from the Caloosahatchee Estuary and Estero Bay, SW Florida. Pesticides - The Impacts of Pesticide Exposure. M. Stoytcheva: 207-220.
- MOLLOY, E. and L. CABRESE (2008). Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with rheumatic diseases: are patients with systemic lupus erythematosus at particular risk? . **Autoimmunity Reviews** 8(2): 144-146.
- MONTAGNER, J. M., T. F. MICHELON, R. B. SCHROEDER, et al. (2007). Polyomavirus – an emergent pathogen in transplant recipients. **Avanços Médicos** 5: 184-189.
- MORAES, I. R. D., N. L. D. MASTRO, M. JAKABI, et al. (2000). Estudo da radiosensibilidade ao <sup>60</sup>Co do *Vibrio cholerae* O1 incorporado em ostras. **Revista de Saúde Pública** 34(1): 29-32.
- MORESCO, V., A. VIANCELLI, M. A. NASCIMENTO, et al. (2012). Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin** 64: 40-48.
- MS (2011). Relatório de Situação Rio Grande do Sul. SNVS. Brasília, Ministério da Saúde: 39 p.
- MUDGE, S. M. and C. G. SEGUEL (1999). Organic contamination of San Vicente Bay, Chile. **Marine Pollution Bulletin** 38: 1011-1021.
- MUNIAIN-MUJIKA, I., R. GIRONES, G. Tofiño-Quesada, et al. (2002). Depuration dynamics of viruses in shellfish. **International Journal of Food Microbiology** 77(1-2): 125-133.
- MURPHREE, R. L. and M. L. TAMPLIN (1991). Uptake and



- Retention of *Vibrio cholerae* O1 in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. **Applied and Environmental Microbiology** 61(10): 3656-3660.
- NIVED, O., A. A. BENGTSSON, A. JÖNSEN, et al. (2008). Progressive multifocal leukoencephalopathy - the importance of early diagnosis illustrated in four cases. **Lupus** 17(11): 1036-1041.
- NOBLE, R. T., I. M. LEE and K. C. Schiff (2004). Inactivation of indicator micro-organisms from various sources of faecal contamination in seawater and freshwater. **Journal of Applied Microbiology** 96: 464-472.
- NOTAR, M., H. LESKOV and J. FAGANELI (2001). Composition, distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons sediments of the Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea. **Marine Pollution Bulletin** 42(1): 36-44.
- NRC (1985). Oil in the sea, inputs, fates and effects. N. R. Council. Washington, National Academy Press: 602.
- ORTEGA, C., H. M. SOLO-GABRIELE, A. Abdelzaher, et al. (2009). Correlations between microbial indicators, pathogens, and environmental factors in a subtropical Estuary. **Marine Pollution Bulletin**: 1-8.
- PAL, A., L. SIROTA, T. MAUDRU, et al. (2006). Real-time, quantitative PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. **Journal of Virological Methods** 135: 32-42.
- PATEL, M. M., A. J. HALL, J. Vinjé, et al. (2009). Noroviruses: A comprehensive review. **Journal of Clinical Virology** 44: 1-8.
- PEARSE, V., J. PEARSE, M. BUCHSBAUM, et al. (1987). Living Invertebrates, Boxwood Press. 10: 848 p.
- PEDERZOLLI, E. M., L. FRONZA, M. GANDRA, et al. (2005). Estudo do comportamento dos hidrocarbonetos alifáticos em ambientes rasos, após simulação de um derrame de petróleo. 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás. Salvador, BA, Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás - IBP.
- PEREIRA, M. A., M. M. NUNES, L. Nuernberg, et al. (2006). Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of

- Florianópolis – Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** 37: 159-163.
- PETRIGNANI, M., L. VERHOEF, R. V. HUNEN, et al. (2010) A possible foodborne outbreak of hepatitis A in the Netherlands, January-February 2010 **Euro Surveillance** 15.
- PILOTTO, M. R. (2011). Estudo temporal da contaminação microbiológica de ostras submetidas a um ambiente altamente impactado. **TCC, Graduação**, UFSC.
- POTASMAN, I., A. PAZ and M. ODEH (2002). Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: A worldwide perspective. **Clinical Infectious Diseases** 35: 921-928.
- POWER, U. F. and J. K. COLLINS (1989). Differential depuration of Poliovirus, *Escherichia coli*, and Coliphage by the common mussel, *Mytilus edulis*. **Applied and Environmental Microbiology** 55(6): 1386-1390.
- PRASAD, B. V. V., L. HU, S. E. CRAWFORD, et al. (2012) Genotype-dependent glycan specificity in rotaviruses – evolution of a new paradigm.
- RICHARDS, G. P. (2003). Human protozoan parasites in molluscan shellfish: epidemiology and detection. Molluscan Shellfish Safety. A. Villalba, B. Requere, J.L.Romalde and R. Beiras. Santiago de Compostela, Spain, Conselleria de Pesca e Asuntos Marítimos, Hunta de Galicia, Spain: 397-405.
- RIGOTTO, C., M. VICTORIA, V. MORESCO, et al. (2010). Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianópolis, South Brazil. **Journal of Applied Microbiology**: 1-9.
- ROBERTSON, L. J., L. HERMANSEN and B. K. GJERDE (2006). Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in sewage in Norway. **Applied and Environmental Microbiology** 72(8): 5297-5303.
- RODRICK, G. E. S., K. R (2003). Molluscan Shellfish Depuration. Proceedings of the 4th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, Santiago de Compostela. A. : VILLABOIA, REGUERA, B., ROMALDE, J., REIS, R. Spain.
- RUSSEL, W. C. (2009). Adenovirus: update on structure and function. **Journal of Genenal Virology** 90: 1-20.

- RUPP, G. S., F. M. D. OLIVEIRA-NETO and J. GUZENSKI (2008). Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en la región sudeste-sur de Brasil. Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. A. Lovatelli, A. Farías and I. Uriarte. Puerto Montt, Chile, FAO. 12: 77-89.
- SALDANHA, G. C. (2006). Diagnóstico ambiental do DDT e seus metabólitos no Lago Puruzinho – AM. **Mestrado**, Universidade Federal de Rondônia.
- SANTOS, A. A. D., A. L. T. NOVAES, F. M. SILVA, et al. (2010). Síntese Informativa da Maricultura. Florianópolis, SC, EPAGRI: 1-7.
- SANTOS, A. A. D., A. L. T. NOVAES, F. M. SILVA, et al. (2013) Síntese Informativa da Maricultura 2012 **EPAGRI-Dados Estatísticos da Aquicultura**, 7.
- SANTOS, S., M. O. O. REZENDE, M. D. LANDGRAF, et al. (2001). Determinação de pesticidas organoclorados em sedimentos coletados no complexo estuarino lagunar de Mundaú-Manguaba – CELMM. **Anais Associação Brasileira de Química** 50(2): 50-58.
- SATTAR, S. A., T. JASON and J. Farber (2000). Foodborne spread of hepatitis A: Recent studies on virus survival, transfer and inactivation. **The Canadian Journal of Infectious Diseases** 11(3): 159-163.
- SCHEIFELE, D. W., G. D. SERRES, V. Gilca, et al. (2010). A nationwide survey of past hepatitis A infections among Canadian adults. **Vaccine** 28(32): 5174-5178.
- SCHETS, F. M., H. H. J. L. v. d. BERG, G. B. Engels, et al. (2007). *Cryptosporidium* and *Giardia* in commercial and non-commercial oysters (*Crassostrea gigas*) and water from the Oosterschelde, the Netherlands. **International Journal of Food Microbiology** 113(2): 189-194.
- SCHMIDT, E. C., L. A. SCARIOT, T. ROVER, et al. (2009). Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. **Micron** 40: 860–869.
- SCHWAB, K. J., F. H. NEILL, M. K. ESTES, et al. (1998).

- Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. **Journal of Food Protection** 61(12): 1674-1680.
- SHERWIN, M. R., E. S. V. VLEET, V. U. FOSSATO, et al. (1993). Coprostanol (5 $\beta$ -cholestan-3  $\beta$ -ol) in lagoonal sediments and mussels of Venice. **Marine Pollution Bulletin** 26(9): 501-507.
- SHIRATO, H. (2011). Norovirus and histo-blood group antigens. **Japanese Journal of Infectious Diseases** 64(2): 95-103.
- SHIRATO-HORIKOSHI, H., S. OGAWA, T. WAKITA, et al. (2007). Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. **Archives of Virology** 152: 457-461.
- SHUMWAY, S. E., T. L. CUCCI, R. C. NEWELL, et al. (1985). Particle selection, ingestion and absorption in filter-feeding bivalves. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 91(1-2): 77-92.
- SILVA, C. A. S. (2000). Avaliação da radiação ultravioleta no controle de microrganismos aderidos em filmes de polietileno de baixa densidade. **Doutorado**, Universidade Federal de Viçosa.
- SIMA, L. C., J. SCHAEFFER, J. C. L. SAUX, et al. (2011). Calicivirus removal in a membrane bioreactor wastewater treatment plant. **Applied and Environmental Microbiology** 77(15).
- SINCERO, T. C. M., D. B. LEVIN, C. M. O. SIMÕES, et al. (2006). Detection of hepatitis A virus (HAV) in oysters (*Crassostrea gigas*). **Water Research** 40: 895— 902.
- SIRIKANCHANA, K., J. L. SHISLER and B. J. MARIÑAS (2008). Inactivation kinetics of adenovirus serotype 2 with monochloramine. **Water research** 42: 1467-1474.
- SNSA (2013). Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2011. M. d. Cidades. Brasília, SNSA: 432.
- SOUZA, D. S. M., R. S. PIAZZA, M. R. PILOTTO, et al. (2013). Virus, protozoa and organic compounds decay in depurated oysters. **International Journal of Food**

**Microbiology.**

SOUZA, D. S. M., A. P. D. RAMOS, F. F. NUNES, et al. (2012). Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 76: 153-161.

SOUZA, R. V., G. S. RUPP, C. J. A. CAMPOS, et al. (2014) Moluscos bivalves: medidas de controle microbiológico para atender às exigências da União Europeia **Documentos** 247, 48.

STANNARD, L. M. (1995). Electron micrograph image of adenovirus.

<http://www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/emimages.html>.

SUNNOTEL, O., W. J. SNELLING, N. MCDONOUGH, et al. (2007). Effectiveness of Standard UV Depuration at Inactivating *Cryptosporidium parvum* Recovered from Spiked Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*). **Applied and Environmental Microbiology** 73(16): 5083-5087.

SUPLICY, F. M. (1998). Ensaios sobre a depuração do mexilhão Perna perna (L.,1758). **Mestrado**, UFSC.

TANIGUCHI, S. (2002). Avaliação da contaminação por hidrocarbonetos e organoclorados em diferentes compartimentos do ambiente marinho do estado do Rio de Janeiro. **Tese de Doutorado**, USP.

TAVARES, M. T., D. D. P. CARDOSO and W. M. E. D. DE BRITO (2005). Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos de controle de qualidade da água. **Revista de Patologia Tropical** 34(2): 85-104.

THOMAS, A., J. C. L. SAUX, J. OLLIVIER, et al. (2011). Norovirus et huîtres : de la terre à la mer ! **Virologie** 15(6): 353-360.

THURSTON-ENRIQUEZ, J. A., C. N. HAAS, J. Jacangelo, et al. (2003). Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. **Applied and Environmental Microbiology** 69: 3979-3985.

UEKI, Y., M. SHOJI, A. SUTO, et al. (2007). Persistence of Caliciviruses in artificially contaminated oysters during depuration. **Applied and Environmental Microbiology** 73(17): 5698-5701.

- UNEP (1992). Determinations of petroleum hydrocarbons in sediment. Reference methods for marine pollution studies. Reference Methods for Marine Pollution Studies UNEP/IOC/IAEA. RSRM 20: 78.
- UPADHYAYA, G. S., R. D. CURRY and L. NICHOLS (2004). The design and comparison of continuous and pulsed ultraviolet reactors for microbial inactivation in water. **Transactions on Plasma Science** 32(5): 2032-2037.
- US/FDA (2007-revision, printed March 2009). Guide for the Control of Molluscan Shellfish 2007. Interstate Shellfish Sanitation Conference. U. F. C. NSSP. Columbia, US FDA/CFSAN & ISSC: 125-547.
- USEPA (2006). Ultraviolet Disinfection Guidance Manual for the Final Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Washington, U S Environmental Protection Agency.
- VALLE, L. D., M. K. WHITE and K. KHALILI (2008). Potential mechanisms of the human Polyomavirus JCV in neural oncogenesis. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology** 67(8): 729-740.
- VICTORIA, M., F. GUIMARAES, T. FUMIAN, et al. (2009). Evaluation of an adsorption-elution method for detection of astrovirus and norovirus in environmental waters. **Journal of Virological Methods** 156(1-2): 73-76.
- VITRAL, C. L., A. M. C. GASPAS and F. J. D. SOUTO (2006). Epidemiological pattern and mortality rates for hepatitis A in Brazil, 1980-2002 - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 101(2): 119-127.
- VOLKMAN, J. K., D. G. HOLDSWORTH, G. P. NEILL, et al. (1992). . Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. **Science of The Total Environment** 112(2-3): 203-219.
- VOLPATO, V. B. (2009). Sobrevivência da *Crassostrea gigas* em depuração usando água marinha natural e água salgada artificialmente. **Trabalho de Conclusão de Curso de graduação**, UFSC.
- VULLIEMOZ, S., F. LURATI-RUIZ, F.-X. BORRUAT, et al. (2006). Favourable outcome of progressive multifocal leucoencephalopathy in two patients with dermatomyositis. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**

77(9): 1079-1082.

WANG, H. (2004). Pathologic quiz case- A 54-year-old deceased man with diffuse subcortical lesions of the central nervous system. **Archives of pathology & laboratory medicine** 128(4): 70-72.

WARD, J. E. (1996). Biodynamics of suspension-feeding in adult bivalve molluscs: Particle capture, processing, and fate. **Invertebrates Biology** 115(3): 218-231.

WARD, J. E., J. S. LEVINTON and S. E. SHUMWAY (2003). Influence of diet on pre-ingestive particle processing in bivalves. I: Transport velocities on the ctenidium. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 293: 129-149.

WARD, J. E., J. S. LEVINTON, S. E. SHUMWAY, et al. (1998). Particle sorting in bivalves: *in vivo* determination of the pallial organs of selection. **Marine Biology** 131: 283-292.

WHO (2010). Safe Management of Shellfish and Harvest Waters. London, IWA Publishing: 360.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs328/en/>

WHO (2013a). Hepatitis A.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs328/en/>, World Health Organization.

WHO (2013b). Weekly epidemiological record (WER). 1st FEBRUARY 2013, 88th YEAR. 88: 49-64.

WEI, J., Y. JIN, T. Sims, et al. (2010). Survival of Murine Norovirus and Hepatitis A Virus in Different Types of Manure and Biosolids. **Foodborne Pathogens and Disease**: 1-6.

WILLIS, J. E., J. T. MCCLURE, J. DAVIDSON, et al. (2013). Global occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in shellfish: Should Canada take a closer look? **Food Research International** 52: 119-135.

WOBUS, C. E., L. B. THACKRAY and H. W. V. IV (2006). Murine Norovirus: a model system to study Norovirus biology and pathogenesis. **Journal of Virology** 80(11): 5104-5112.

YENC, C., J. E. TATE, M. M. PATEL, et al. (2011). Rotavirus vaccines: Update on global impact and future priorities. **Human Vaccines** 7(12): 1282-1290.

ZHENG, D. P., T. ANDO, R. L. FANKHAUSER, et al.  
(2006). Norovirus classification and proposed strain  
nomenclature. **Virology** 346: 312-323.



## Apêndices

### ***Apêndice A – Atividades realizadas durante estágio doutoral, tipo sanduíche, no Laboratório de Microbiologia do IFREMER, França.***

Os trabalhos descritos neste apêndice foram realizados por meio de estágio doutoral, tipo sanduíche, no Laboratório de Microbiologia do *Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer* (IFREMER), Nantes, França, sob a supervisão da Dra Françoise Soizick Le Guyader. Este estágio teve a duração de 11 meses, sendo realizado de janeiro a novembro de 2013.

Durante o estágio foram realizados dois experimentos. O primeiro consistiu no estudo da dinâmica de bioacumulação artificial de *C. gigas*, por quatro genótipos do NoV GI e SAV. Já o experimento subsequente, consistiu de testes de inativação do RV humano (HAL 1166) pelo calor, em tempos determinados. Estes testes ocorreram durante o preparo de um prato típico da culinária francesa (*Moules Marinières*), utilizando-se mexilhões da espécie *Mytilus edulis*, artificialmente contaminados com esses vírus.

#### **1. Estudo da dinâmica de bioacumulação artificial de *C. gigas*, por NoV GI e SAV**

##### **1.1.1. Delineamento experimental**

Durante o período de 11 meses foram realizadas três repetições, em diferentes semanas dos meses de outubro e novembro de 2013, de testes de bioacumulação artificial de *C. gigas*, com NoV GI (genótipos: 1, 2, 4 e 7) e SAV (I.2 e IV), no Laboratório de Microbiologia do IFREMER, em Nantes. Os ensaios de bioacumulação foram realizados em câmara fria, por 24 h, com temperatura das águas dos aquários mantidas a 14°C, com aeração constante. Antes de serem distribuídas nos aquários com os vírus-modelo (um aquário por vírus-modelo e um controle negativo, sem vírus), as ostras permaneceram em estado de aclimação, durante 14-16 h em tanques com águas na mesma temperatura em que seriam realizadas as bioacumulações. Na manhã seguinte, os bivalves foram distribuídos em aquários (20 ostras por aquário) contendo 10 L de água do mar filtrada, inoculados com um dos

vírus-modelo (uma espécie por aquário). Os inóculos utilizados consistiram em suspensões fecais humanas a 10%, preparadas em PBS, contendo cada um dos vírus e alíquotadas em volumes de 2 mL cada, a fim de que fossem utilizados 2 mL por bioacumulação. As alíquotas que seriam utilizadas nas bioacumulações seguintes, permaneceram a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até seu uso. Amostras de 10 ostras foram coletadas nos tempos 0 (na chegada ao laboratório), 1 e 24 h de bioacumulação. Seus tecidos digestivos (TDs) imediatamente dissecados e analisados. Também foram coletadas amostras de 100 mL de água de cada um dos aquários, após 1 e 24 h de bioacumulação.

## 1.1.2. Materiais e metodologias utilizadas

### 1.1.2.1. Controle externo e eficácia da extração (EF)

Em cada amostra de tecido de ostra e de água de bioacumulação analisadas, foi introduzido um controle externo às amostras, para os procedimentos de eluição e de concentração viral aplicados. Este controle consistiu de uma suspensão com  $10^6$  50% TCID<sub>50</sub> de Mengovírus (MV), cepa vMC<sub>0</sub> e foi adicionado no início das eluições/concentrações virais, em cada uma das amostras de TD de ostra e de água. O MV pertence à família *Picornaviridae* e é causador de doenças em murinos. Possui propriedades físico-químicas e estruturais próximas ao HAV, sendo não envelopado e com genoma de RNA simples fita (LTC 2012).

O EF foi calculado através da razão de MV detectado pelo MC inoculado na amostra:

$$EF = \frac{MV \text{ detectado na amostra}}{MV \text{ inoculado na amostra}}$$

O valor de C<sub>q</sub> (*quantification cycle*) obtido na quantificação do controle externo, em cada amostra positiva, foi comparado ao C<sub>q</sub> obtido com a curva-padrão confeccionada por meio de diluições do AN de MV. Essa diferença ( $\Delta C_q$ ) foi usada para determinação da eficiência da extração, por meio da fórmula  $100e^{-0.6978\Delta C_q}$ , sendo este valor expresso em porcentagem por amostra (LE GUYADER et al. 2009). Somente as amostras que apresentaram resultados da  $EF \geq 5\%$ , prosseguiram diretamente para a investigação dos outros dois gêneros virais (NoV GI e SAV). As amostras em que o índice foi inferior a 5%, foram submetidas a nova eluição e extração usando-se uma segunda alíquota de 1,5 g de TD ou de 40 mL de água de bioacumulação.

### 1.1.2.2. Eluição e concentração viral e extração dos ANs

Após dissecação das ostras, uma alíquota de 1,5 g de cada amostra foi submetida à eluição e concentração das partículas virais, segundo descrito por LE GUYADER et al. (2008), com algumas modificações. Para isso, os TD foram inoculados com o MV (controle externo), já descrito anteriormente, os TDs dissecados e homogeneizados em Tampão Glicina (TG), pH 9,5, com o auxílio de um triturador de tecidos, tipo *potter*. Após este passo, foi acrescido a cada amostra, clorofórmio/butanol (1:1) e Catfloc-T (Calgon, Ellwood City, PA), com objetivo de eluir as partículas virais presentes e clarificar a amostra. Esta permaneceu em agitação por 5 min, a TA, e decorrida esta incubação, o tubo foi centrifugado a 13.500 x g por 15 min, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, acrescido de PEG-6000 (Sigma, St. Quentin, France) a 24%, em NaCl, e incubado por 1 h, sob agitação, a 4°C. O tubo foi centrifugado a 11.000 x g por 20 min e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspense em água estéril e em tampão de lise (bioMérieux, France), incubado a 56°C por 30 min, sendo a extração dos ANs realizada pelo NucliSens kit (BioMérieux, France), de acordo com as instruções do fabricante (GRODZKI et al. 2012).

Após 24 h de bioacumulação foram coletadas amostras de água (100 mL/aquário), para que as partículas virais presentes fossem concentradas e precipitadas por PEG 6000, segundo descrito por SILVA et al. (2007). Sendo assim, 40 mL de cada amostra, foi acrescido de uma solução a 50% de PEG 6000, e do controle positivo externo com MV. A solução foi homogeneizada a 4°C, por 14 a 16 h e centrifugada a 13.500 x g por 90 min a 4°C. Descartado o sobrenadante, o sedimento foi ressuspense em água estéril e tampão de lise (BioMérieux, France). A amostra foi incubada a 56°C por 30 min para início do processo de extração dos AN, utilizado o kit comercial NucliSens kit (BioMérieux, France), de acordo com as instruções do fabricante.

Os ANs extraídos das amostras de ostras e água de bioacumulação, foram ressuspense em água tratada com DEPC e conservados a -80°C até serem submetidos a (RT) qPCR. Previamente aos ensaios enzimáticos, os ANs foram diluídos 10 vezes para evitar efeitos inibitórios.

### 1.1.2.3. Detecção e quantificação viral por RT qPCR

O número de cópias genômicas de NoV GI, presente em cada amostra positiva, foi estimada tendo por base as curvas geradas, a partir de RNAs transcritos das duas primeiras janelas de leitura do vírus Norwalk, GI.1(nucleotídeos 146-6935, GenBank nº M87661), fragmentos gentilmente doados pelo Dr. Robert Atmar (Baylor College of Medicine, Houston, TX), que foram clonados em vetor pCRII TOPO (Invitrogen) (LE GUYADER et al. 2009).

Para o preparo da curva-padrão utilizada na detecção dos SAVs humanos, utilizou-se produto de PCR de um fragmento de 500 nucleotídeos, da junção polimerase-capsídeo. Este fragmento foi inserido em um vetor pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) (OKA et al. 2006).

Na quantificação dos MV foram utilizadas diluições seriadas dos AN desses vírus.

Nas reações de RT qPCR realizadas nas ostras e águas de bioacumulação para os genótipos do NoV GI e SAV (0, 1 e 24 horas de bioacumulação), e na quantificação da recuperação do controle externo inoculado, MV, foram utilizados iniciadores, sondas e protocolos já padronizados no laboratório sendo que as sequencias estão descritas no QUADRO 1 deste Apêndice A. Para detecção e quantificação dos NoVs, SAVs e MV presentes nas amostras, foram utilizados os mesmos tempos de incubação e temperaturas descritos por LE GUYADER et al. (2008), OKA et al. (2006) e PINTÓ et al. (2009), respectivamente. As reações enzimáticas foram realizadas separadamente para os três vírus (reações em um único passo), em soluções cujos volumes finais eram de 25 µL. Utilizou-se o kit comercial RNA UltraSense™One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, França), mistura que contém os reativos necessários para as reações de PCR, como oligonucleotídeos e as condições salinas adequadas, segundo as orientações do fabricante do kit. Foram acrescentadas à mistura, ROX reference dye e RNA UltraSense™Enzyme Mix (com RNaseOUT™ inibidor de ribonucleases), além dos iniciadores e sondas citados, nas concentrações de 0,25 µM de sondas e 0,50 µM dos iniciadores, para cada vírus, e 5 µL de cada amostra, por reação e em duplicada. As amostras foram processadas puras e diluídas dez vezes.

O protocolo de temperaturas e tempos de incubação seguidos, durante as reações enzimáticas de RT qPCR, foi de 50°C por 30 min e

95°C por 5 min para denaturação, durante a RT, seguido de 45 ciclos a 95° por 15 s, 60°C por 1 min, tanto para anelamento dos iniciadores e sondas, quanto para extensão. As reações enzimáticas aconteceram em placas de 96 poços em um termociclador MX3000 (Stratagene, França).

**QUADRO 1- Iniciadores sondas utilizados na detecção de NoV GI e SAV por RT qPCR**

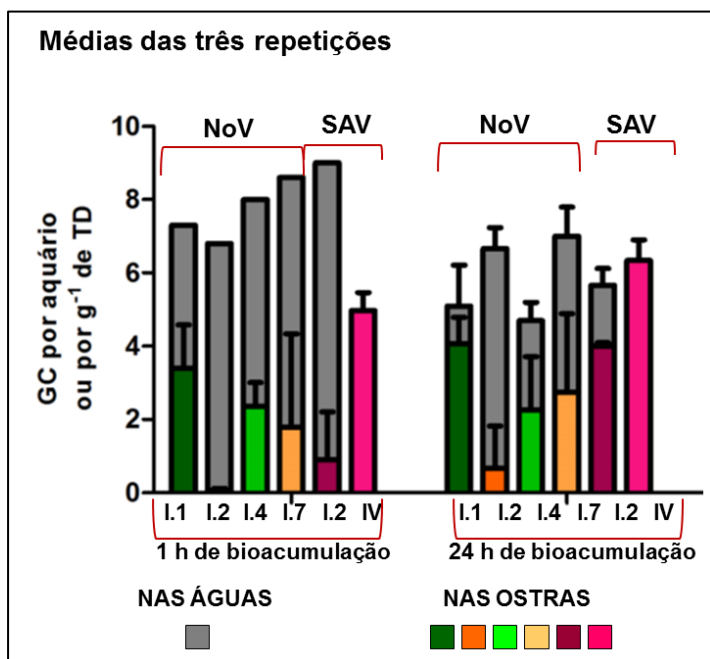
<b>INICIADORES E SONDAS</b>	<b>SEQUÊNCIAS (5'-3')</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>
<b>NoV GI</b>		LE GUYADER et al. (2008)
<b>QNIF4</b>	CGCTGGATGCGNTTCCAT	
<b>NV1LCR</b>	CCTTAGACGCCATCATCATT TAC	
<b>NVGG1P</b>	6-FAM-TGGACAGGAGAY CGCRATCT-BHQ	
<b>SAV</b>		OKA et al. (2006)
<b>SAV_F1</b>	TTGGCCCTCGCCCACCTAC	
<b>SAV124F</b>	GAYCASGCTCTCGCYACCTA C	
<b>SAV1245R</b>	CCCTCCATYTCAAACACTA	
<b>SAV124TP</b>	6-FAM-CCRCCTATRAACCA- MGB	
<b>MV</b>		
<b>Mengo 110F</b>	GCGGGTCCTGCCGAAAGT	PINTÓ et al. (2009)
<b>Mengo 209R</b>	GAAGTAACATATAGACAGA CGCACAC	
<b>Mengo 147P</b>	FAM-ATCACATTACTGGCCG AAGC-MGB	

### 1.1.3. Resultados

Nas bioacumulações realizadas, notou-se que os vírus utilizados (NoV e SAV) foram bioacumulados com diferentes intensidades, através do tempo. Enquanto que algumas cepas virais foram bioacumuladas em maior quantidade, já na primeira hora de exposição do molusco, outras necessitaram de mais tempo para que estas fossem bioacumuladas (Figura 1). Essa diferença foi significativa à ANOVA, quando comparados os resultados dentre as espécies virais nas ostras ( $P < 0,0001$ ). Também houve diferença dentre os resultados tempos analisados, 1 e 24 h, ( $P = 0,0155$ ). Sendo a diferença exibida por cada espécie viral, durante a bioacumulação, responsável pela maior parte dessa variação detectada (61%). O Teste de Bonferroni atribuiu estas diferenças, principalmente, aos resultados dos NoV GI.2 e GI.7, quando comparados aos demais vírus.

Quando comparado aos genótipos do NoV GI, o SAV GIV, foi rapidamente bioacumulado pelas ostras, mais de 4 logs em 1 h, (Figura 1). Após 24 h, a concentração dele, nos tecidos das ostras, foi a mais alta, dentre os demais vírus. Já o SAV GI.2 não foi bioacumulado na mesma rapidez, pois nas análises das ostras após 1 h, a média das 3 bioacumulações era discreta (máximo de 1 log), mas após 24 h, aproximadamente a metade dos vírus adicionados ao aquários foram transferidos para o TD das ostras. Dentre os genótipos do NoV GI, após 1 h de bioacumulação (média das concentrações virais obtidas nos três ensaios), as quantidades de vírus detectadas nas ostras eram distintas; enquanto que o GI.1 atingia resultados superiores a 3 logs de GC por grama de TD de ostra, a detecção do genótipo 2 ficou próxima ao limite inferior de detecção da RT qPCR e o 7 estava em concentração menor que 2 logs  $g^{-1}$  de TD. Foi detectada diferença pela ANOVA e Teste de Bonferroni, na comparação do NoVs GI.1 com o GI.2 ( $P < 0,01$ ), nos tempos 1 e 24 h de bioacumulação. Dentre os NoVs testados, a ordem decrescente das bioacumulações obtidas foram: GI.1, GI.4, GI.7 e GI.2, após 1 h e também, 24 h (Figura 1).

**Figura 1-Médias das concentrações de NoV GI e de SAV, na água do aquário e no tecido digestivo de *C. gigas*, dos três ensaios de bioacumulações virais por ostras.**



#### 1.1.4. Discussão

Devido à capacidade do NoV GI se ligar aos receptores celulares, semelhantes aos expressos por algumas células humanas, ABH e Lewis, situados no TD das ostras *C. gigas*, a remoção deste vírus pela depuração do molusco se torna uma tarefa árdua. Estudos que investiguem esta ligação, vírus entérico-célula de ostras, são raros e até o momento da realização dos experimentos, cujos resultados são apresentados no corrente capítulo desta tese, não havia estudos publicados disponíveis, que fizesse a comparação entre os genótipos do NoV GI, durante ensaios de bioacumulações por ostras *C. gigas*. A inclusão do SAV nessa comparação é relevante, pois ele é pertencente

à mesma família do NoV e tem sido cada vez mais detectado em episódios de gastroenterites associadas ao consumo de ostras.

Os vírus de genoma RNA apresentam maior variabilidade genética, por exibirem maiores taxas de mutação, ocasionadas por suas enzimas de replicação. Por se tratarem de vírus de genoma RNA, os NoVs e SAVs, também estão sujeitos a esta maior variabilidade genética (XERRY et al. 2010).

DONALDSON et al. (2010) relataram que esta taxa é elevada no NoV GII.4, o que permite que ele continue sendo, ano após ano, o maior responsável pelos surtos mundiais de gastroenterites, atribuídas aos NoVs (em torno 80% dos casos). Essa variabilidade apresentada por ele, torna o organismo do hospedeiro, vulnerável a uma segunda infecção por GII.4. Estudos revelam que quando comparado ao GII.4, o NoV denominado vírus *Norwalk*, ou GI.1, vem sofrendo pequenas modificações nos últimos 40 anos, variando somente em 37% os aminoácidos do capsídeo viral (DONALDSON et al. 2010; LINDESMITH et al. 2011). Os NoVs são agrupados de acordo com a sequência de aminoácidos do capsídeo em: (a) uma mesma espécie, quando a diferença na sequência é menor que 14,3%; (b) mesmo genótipo, quando a diferença está entre 14,3 a 43,8% e (c) mesmo genogrupo, quando a diferença está situada entre 45 a 61,4% (ZHENG et al. 2006). Portanto, embora pertencentes a um mesmo gênero, estas diferenças são cruciais no momento da identificação de um antígeno viral, pelos anticorpos do hospedeiro, ou no momento da adsorção do vírus a um receptor na superfície celular (de células humanas ou de ostras).

LE GUYADER et al. (2008) observaram diferenças na eliminação de dois genogrupos do NoV dos tecidos digestivos dos moluscos bivalves. Descreveram que após um incidente de contaminação, em uma região de cultivo de moluscos bivalves, na França, cuja contaminação detectada nos tecidos das ostras, naquela ocasião, foi de 59% e 70%, para NoVs GI e GII, respectivamente, das amostras analisadas. Em uma segunda análise amostral, realizada 4 semanas após o evento da contaminação, a prevalência era de 41% e 17%, para GI e GII, respectivamente, nas ostras, mostrando que o GI permanece por mais tempo nos TD das ostras. Outro estudo, envolvendo VLPs (Vírus Like Particles, pseudopartículas virais recombinantes) dos genogrupos I e II dos NoVs, mostrou que ambos os genogrupos se ligam aos receptores celulares, semelhantes ao ABH



e Lewis, presentes nas ostras, mas que o GII também se liga aos resíduos de ácido siálico presentes no manto e brânquias destes animais (MAALOUF et al. 2010). Sabe-se que embora o NoV GII esteja em maior concentração em matrizes de água do que o GI, necessita de aproximadamente 1.200 cópias de RNA/L para que uma única partícula viral seja bioacumulada pela ostra, enquanto que o GI, necessita de apenas 30 cópias (LE GUYADER et al. 2012). A capacidade que o GII tem de se ligar também aos resíduos de ácido siálico, pode promover uma redução na concentração de partículas virais bioacumuladas, pois uma parte destas partículas, podem se ligar aos tecidos mais externos da ostra, como brânquias e manto, reduzindo a quantidade bioacumulada nos TDs.

HUANG et al. (2005) afirmou que mesmo em espécies distintas de NoVs, pertencentes ao mesmo genótipo, podem estar presentes diferentes perfis de ligação aos receptores celulares. Tais diferenças provavelmente produziram o comportamento distinto dentre os genótipos do GI, durante os experimentos de bioacumulação realizados neste capítulo da tese. CHOI et al. (2008) relatou que num estudo realizado com VLPs NoV GI, observou-se que mesmo quando era substituído um único aminoácido (histidina ou triptofano por alanina), a ligação da partícula viral ao receptor celular era impedida. Embora estudo relate a ausência de grandes variações no NoV GI.1, pouco se sabe sobre variações dentre os demais genótipos deste genótipo. O que foi observado, no decorrer dos experimentos de bioacumulação, realizados neste capítulo, foi à ocorrência de diferentes intensidades e velocidades na retenção das distintas espécies virais estudadas, mesmo em espécies pertencentes ao mesmo genótipo, como no caso dos genótipos do NoV GI. Os resultados das bioacumulações dos genótipos 2 e 7, deste gênero, mostraram que embora as quantidades dos vírus, acrescentadas aos aquários fossem semelhantes a dos demais (em torno de 7 logs), estes foram fracamente retidos nos TD das ostras, permanecendo a maior parte nas águas de bioacumulação. LE GUYADER et al. (2012), na comparação realizada sobre a frequência dos genótipos do NoV GI, em episódios de gastroenterites, associadas ao consumo de moluscos bivalves, expôs que o GI.2 é encontrado em menor frequência nos tecidos dos ostras, quando comparado ao 1 e ao 4. Ela também afirmou que as detecções destes três genótipos, nas ostras, segue a mesma proporção das concentrações, encontradas nos TD, neste capítulo (GI.1, seguido

pelo 4 e pelo 2). Isto pode indicar que a bioacumulação deste genótipo é realizada com menor eficiência, do que dos genótipos 1 e 4, pelas ostras. Gastroenterite por NoV, associada ao consumo de bivalves, pode ser desencadeada, mesmo que a quantidade de partículas virais nos tecidos do molusco, estejam abaixo do limite de detecção das técnicas utilizadas na investigação, já que a dose infecciosa mínima necessária para o desenvolvimento da doença é extremamente baixa (10 partículas virais). Este fato foi constatado por LE GUYADER et al. (2012), pois apesar de o GI.2 ser detectado nas fezes dos pacientes com frequência semelhante ao do GI.4, o número de detecções do genótipo 2 nos TD das ostras, responsáveis pela veiculação do vírus, era muito inferior. O genótipo 1 foi o mais bioacumulado, dentre os NoVs, fato que reforça os resultados encontrados por diversos grupos de pesquisa, que têm associado, anualmente, a presença deste genótipo em episódios de gastroenterites em decorrência do consumo de ostras contaminadas (LE GUYADER et al. 2012).

Embora pertencentes à mesma família dos NoV e também estarem relacionados às gastroenterites veiculadas por ostras, os SAVs não reconhecem os receptores HBGA e Lewis, como os NoVs, conforme descreveu SHIRATO-HORIKOSHI et al. (2007), em pesquisa utilizando-se de VLPs dos SAVs GI e GV. Mesmo assim, nos ensaios de bioacumulação que foram realizados nesta tese, as espécies virais deste gênero foram rapidamente bioacumuladas pelas ostras, sendo que, ao final (após 24 h), o GIV deste vírus foi o responsável pela maior concentração viral nos tecidos das ostras, quando comparado às outras espécies estudadas. Ainda pouco se sabe sobre a forma como a interação SAV-ostra acontece, pois raras são as publicações sobre o assunto.

São necessários outros estudos, para que se compreenda inteiramente à dinâmica do processo de bioacumulação viral dos NoVs e dos SAVs pelas ostras; também necessita-se de um aprofundamento sobre as dinâmicas de associação destes vírus às partículas em suspensão; fato que poderia interferir na bioacumulação destes vírus pelas ostras. No ambiente aquático, os vírus tendem a permanecer associados às partículas em suspensão, situação que poderia determinar sua sedimentação, caso a ligação ocorresse com as partículas maiores ou mais densas. Além do que, esta associação poderia também favorecer, dificultar ou até impedir sua bioacumulação, caso as partículas estivessem fora das condições

próprias (tamanho, carga, etc; conforme já descrito na Revisão Bibliográfica desta tese) para a ingestão pelos animais. Sabe-se que os dois principais genogrupos do NoV, responsáveis por doenças em humanos, GI e GII, quando são submetidos aos protocolos de tratamento utilizados nas estações de tratamento de esgotos, exibem comportamentos distintos frente aos tratamento implementados. Embora o GII seja mais prevalente na população e nos afluentes residuais nas estações de tratamento, o GI é detectado numa frequência muito maior nos efluentes residuais tratados (HARAMOTO et al. 2006; LA ROSA et al. 2010). Esta diferença de comportamento poderia ser influenciada, p. ex., pelo perfil de associação de cada genogrupo às partículas presentes nas águas residuais, fazendo com que o GI fosse mais resistente aos estresses destes ambientes, do que o GII.

### **1.1.5. Conclusão**

As diferenças, na intensidade e velocidade, observadas nas bioacumulações destas espécies virais, pelas ostras *C. gigas*, podem ter sido ocasionadas por pequenas alterações, ou inversões, nas sequencias dos aminoácidos constituintes do capsídeo viral (domínio P2 da proteína VP1) das espécies de NoV e SAV envolvidas. Porém, uma maior investigação seria necessária, a fim de confirmar estas alterações. A continuidade desse estudo, realizado durante o estágio doutoral, possibilitaria outras informações necessárias à compreensão dos diferentes comportamentos apresentados por pelas espécies virais estudadas, durante o processo de bioacumulação pelas ostras.

## ***2. Investigação da inativação do RV, durante cozimento, nos tecidos de mexilhões (*M. edulis*), artificialmente contaminados***

### **2.1. Materiais e Metodologias Utilizadas**

#### **2.1.1. Moules Marinères**

Para os ensaios de inativação do RV humano em mexilhões (*M. edulis*, 20 animais/amostra) artificialmente contaminados, foram realizadas quatro repetições, em laboratório, do preparo de um prato

típico da culinária francesa, *Moules Marinières*. Além dos mexilhões, ao prato foram incluídos 10 mL de óleo de soja, 100 mL de vinho branco, sal e pimenta-do-reino. O cozimento foi interrompido após 1, 3 ou 5 min, cronometrados a partir do início do processo de ebulição. A temperatura foi medida, com o auxílio de um termômetro digital, na superfície do tecido do animal, imediatamente à interrupção do cozimento. Ao final de cada tempo, todos os mexilhões da panela eram dissecados para que seus TDs fossem analisados. A eluição das partículas virais de RV presentes nos TDs dos mexilhões foi realizada segundo protocolo descrito a seguir. Cada amostra foi imediatamente encaminhada ao Laboratório de Cultivo Celular, a fim de que se investigasse a presença de RVs infecciosos nas amostras. Foi utilizada a técnica de Placa de Lise, por meio de protocolo modificado de ARNOLD et al. (2009).

### 2.1.2. Preparo das Suspensões Virais com RV

Nestes experimentos de inativação térmica, foram utilizados RV humanos HAL 1166 (doados por Dra. Mary K. Estes, Baylor College of Medicine Houston TX, USA), (HU et al. 2012), produzidos em células MA 104 (células renais de macaco-verde africano), que foram cultivadas em meio de cultura Eagle's minimal essencial médium, MEM 1X (Gibco®, Life Technologies Corporation, Fr), suplementado com 10% (v/v) de SFB (Gibco®, Life Technologies Corporation, Fr), L-Glutamin (20 mM, Gibco®, Life Technologies Corporation, Fr), streptomycin (100  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), penicillin G (100 U  $\text{ml}^{-1}$ ) e amphotericin B (0.025  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) (antibiotic-antimycotic 100X, Gibco®, Life Technologies Corporation, Fr), incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, durante 24 h. Os mesmos antibióticos e antifúngicos foram utilizados em todos os experimentos envolvendo cultura celular, com as células MA 104 e o RV, na mesma concentração citada.

Nos ensaios de Placa de Lise utilizados, as células MA 104, foram cultivadas em MEM 1X, como descrito anteriormente, mas sem SFB e com meio suplementado com HEPES (20 nM) e tripsina pancreática porcina, numa concentração final de 0,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (Sigma-Aldrich® Chimie, Fr).

Na inoculação dos mexilhões e na titulação viral realizada, em cada Placa de Lise (item 2.1.5), foram utilizadas suspensões de RV HAL 1166 a 10<sup>9</sup> PFU/mL (10<sup>10</sup> GC/mL).

### **2.1.3. Contaminação dos mexilhões**

Previamente à realização dos testes de inativação dos RVs pelo calor, mexilhões tiveram  $10^7$  PFU de RVs HAL 1166, por animal, inoculados diretamente em seus TDs (inóculo constituído de uma suspensão viral em MEM, já descrita anteriormente, e inoculado com uma micropipeta). Após a inoculação, os mexilhões foram incubados a 4°C por 30 min, a fim de permitir que os vírus se ligassem aos receptores celulares dos bivalves. Decorrido o tempo de incubação, os animais (20 mexilhões/amostra) tiveram seus TDs dissecados e aliquoteados em tubos, com 1,5 g cada, e permaneceram a -80°C até serem processados.

### **2.1.4. Eluição viral**

Cada amostra de TD de mexilhão, contendo 1,5 g, foi submetida à eluição viral com TG, pH 9,5. Para isso, 1,5 g de TD foram triturados, em 2,5 mL de TG, centrifugado a 15000 x g, por 15 min a 4°C; após a centrifugação, 1 mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O pH deste sobrenadante foi neutralizado, com HCl 2N, tratado com PSA (penicilina, estreptomicina e anfotericina B), nas concentrações já descritas no corrente capítulo. O sobrenadante foi incubado a 37°C, por 30 min, com 1,0 µg de tripsina pancreática Porcina, para a ativação do RV, através da clivagem da proteína VP4 em dois peptídeos, VP5 e VP8, o que aumenta a infecciosidade viral (ARIAS et al. 1996). Concluído o tempo de incubação, foi coletado 100 µL de cada amostra, para extração dos ANs e quantificação viral por RT qPCR, descrito a seguir, e o restante da amostra prosseguiu para investigação da infecciosidade viral por Placa de Lise.

### **2.1.5. Placa de Lise**

Cada amostra tratada com tripsina, para a ativação da infecciosidade do RV foi diluída 1:5 em MEM 1X (sem SFB), diluição testada como não citotóxica às MA 104, e inoculada (1 mL por poço, em triplicata) em uma placa com 6 poços, com monocamadas confluentes de MA 104, previamente lavadas 2 vezes com PBS, para dar início à adsorção viral às células MA 104, durante 1 h, a 37°C/5%CO<sub>2</sub>.

Decorrido o período de incubação, os inóculos foram removidos e substituídos por uma camada (3 mL por poço) de agarose (MP Biomedicals, LLC) com concentração final de 0,6%, diluída em MEM 2X, sem vermelho neutro (Sigma-Aldrich® Chimie, Fr), suplementada com PSA, 2 % L-glutamina, 1,5% de bicarbonato de sódio e  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de tripsina pancreática porcina. Cada amostra foi incubada a  $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2/72 \text{ h}$ . Decorridas 48 h de incubação, para melhor visualização das placas formadas, cada poço foi corado por uma solução de vermelho neutro com concentração final de 0,03%, em PBS, durante 3 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após esse período, o corante foi removido e as placas contadas. Foram utilizados controles negativos (TD de mexilhões não inoculados com RV, submetidos ao mesmo processo de eluição descrito) e positivos (100  $\mu\text{L}$  da suspensão viral, utilizada para inoculação dos mexilhões).

### **2.1.6. Extração de AN**

Como já descrito no item 2.1.4 deste Apêndice A, antes de cada amostra ser inoculada em cultura celular, 100  $\mu\text{L}$  do eluato tratado com Tripsina Pancreática Porcina foi submetida à extração de AN e RT qPCR.

Os AN foram extraídos utilizando-se o NucliSens Kit (BioMérieux, France), de acordo com as instruções do fabricante. Primeiramente, 1 mL de água tratada com DEPC e  $10^6$  50% TCID<sub>50</sub> de MV, como controle externo já relatado, no item I.2.a deste Apêndice A, foram adicionados aos 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra eluída por TG, para que em seguida fossem submetidas à incubação a  $56^{\circ}\text{C}$ , por 30 min, para início da lise viral. Decorrida esta incubação, os ANs foram extraídos, ressuspensos em 100  $\mu\text{L}$  e em seguida diluídos dez vezes para que fossem submetidos às reações de RT qPCR.

### **2.1.7. Análises moleculares dos mexilhões**

Nas detecções e quantificações do RV humano por RT qPCR, foram utilizadas curvas-padrão confeccionadas com produtos de PCR do gene NSP3 (inseridos em plasmídeos) de RRV (Rhesus Rotavirus), doados pelo Dr. Didier Poncet (Virologie Moléculaire et Structurale, Centre de Recherche de GIF, France).

Primeiramente foi realizada a quantificação de MV (controle externo às amostras, para avaliar a EF) e as amostras que apresentaram

uma recuperação viral  $\geq 5\%$  foram encaminhadas para a investigação do RV. Amostras em que a eficácia da extração se mostrasse inferior a este valor, seriam submetidas a uma nova extração. Previamente às reações de RT qPCR, cada amostra sofreu a desnaturação dos AN, sendo incubadas a  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 min e transferidas para banho de gelo por 3 min, para então, ser processada (AN sem diluir e diluído 10 vezes) por RT qPCR, em duplicata, em placas de 96 poços para o início das reações enzimáticas. Nas reações de RT qPCR foram utilizados iniciadores, conforme descreveu PANG et al. (2004), mas com sonda modificada pelo Dr. Takayuki Miura, Laboratório de Microbiologia do IFREMER, cuja sequência foi FAM- TGAGCACAATAGTTAAAAGC -MGB-NFQ. Na quantificação do MV foram utilizados os mesmos iniciadores, sondas e protocolos já descritos na metodologia do Quadro I, deste Apêndice A.

## 2.2 . Resultados e discussão

O consumo de moluscos bivalves através dos anos tem inspirado uma diversidade de receitas culinárias, com grande variedade de ingredientes, temperaturas e tempos de cozimento. O consumo de ostras cruas é mundialmente difundido, principalmente na França, que é um grande produtor e consumidor destes bivalves. Tradicionalmente, os mexilhões são consumidos somente após o cozimento, mas em alguns casos, o tempo requerido pelas receitas não é suficiente para a inativação de patógenos humanos virais, que podem estar alojados nos tecidos destes moluscos. No Brasil, a tradição do consumo de bivalves levemente cozidos, *ao bafo*, é mais difundida que o consumo *in natura*, o que também não descarta a presença de patógenos humanos virais, mesmo após a elaboração do prato.

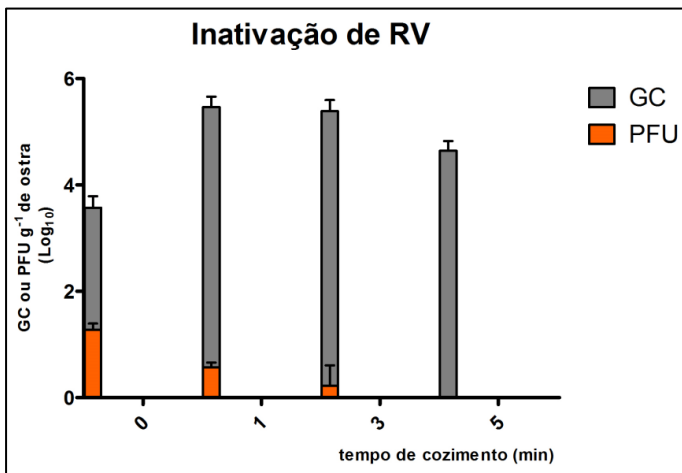
A receita utilizada na investigação proposta neste Apêndice, *Moules Marinières*, é muito apreciada e difundida entre os franceses, principalmente nas cidades litorâneas, sendo por este motivo, escolhida como objeto de investigação.

A quantidade média de TD em cada amostra de 20 mexilhões foi de 4,5 g e o valor esperado de RV por grama de TD (GC  $\text{g}^{-1}$  e PFU  $\text{g}^{-1}$ ) era de  $10^8$  GC  $\text{g}^{-1}$  e  $10^6$   $\text{g}^{-1}$  PFU, entretanto, a média das quantificações, em amostras cruas, por RT qPCR e Placa de Lise foi de  $10^3$  GC  $\text{g}^{-1}$  e  $10^1$  PFU  $\text{g}^{-1}$ , respectivamente. Além da perda ocorrida,

provavelmente nas inoculações virais nos TDs dos mexilhões e na eluição viral por TG, revelada pelas duas metodologias utilizadas, os resultados obtidos pela RT qPCR indicaram que as amostras cruas, apresentaram um forte efeito inibitório às reações enzimáticas, já que estas amostras apresentaram os resultados de recuperação viral mais baixos, dentre os tratamentos de cozimento realizados. Nas amostras submetidas ao cozimento, mesmo que por 1 min, houve aumento na recuperação de cópias genômicas virais (GC), (Figura 2). Estes resultados podem indicar que amostras de mexilhões crus, como as utilizadas neste ensaio, não funcionam como controles positivos fidedignos para as reações enzimáticas. Ao serem comparadas às amostras cozidas, as cruas não permitiram que fosse traçada uma cinética de decaimento viral nos tecidos, pois elas já exibiam valores de GC menores do que as demais amostras analisadas. Essa diferença nos resultados das amostras cruas e cozidas, foi considerada estatisticamente significativa pela ANOVA ( $P=0,240$ ). A inibição percebida nas amostras cruas pode ter sido maior em decorrência do método de eluição viral utilizado, com TG, pois nele é realizado somente a separação das partículas virais das células do molusco, por meio de um pH alcalino (9,5), sem que seja realizada uma etapa de clarificação (como acontece na eluição e precipitação por PEG), onde substâncias ou moléculas inibidoras às reações enzimáticas podem ser reduzidas, no decorrer do processamento de cada amostra. A eluição viral por TG, também pode ter influenciado a baixa detecção da infecciosidade do RV nas placas de lise. Embora o pH da amostra tenha sido imediatamente neutralizado, ao final da eluição, o tempo necessário para a separação do sedimento (restos de TD do molusco) e do sobrenadante (com os vírus), durante a centrifugação de 15 min, pode ter sido suficiente para danificar proteínas do capsídeo viral (como a VP4), responsáveis pela adsorção do vírus às células MA 104, ocasionando detecções abaixo do esperado na cultura celular (Figura 2). Os valores encontrados nas amostras cruas, submetidas à Placa de Lise, quando estatisticamente comparados aos demais tratamentos utilizados, por ANOVA, se mostraram significativos ( $P<0,0001$ ).



**Figura 2-Cinética da inativação do RV pelo calor, medidas em cópias genômicas (GC), por RT qPCR e por unidade formadora de placa (PFU), por Placa de Lise.**



As maiores detecções genômicas de RV nas repetições realizadas ocorreram nas amostras em ebulição por 1 min, sendo também o segundo maior valor de RV infecciosos detectados. Isto demonstrou que esse tempo foi suficiente para reduzir os inibidores das reações enzimáticas, mas não danificou o genoma viral ao ponto de reduzir sua detecção e não inativou todos os vírus presentes nas amostras, pois havia RV infecciosos nas quatro repetições realizadas (Figura 2). A temperatura medida na superfície dos tecidos dos mexilhões, nesse tempo de cozimento, revelou que sua média foi de 81°C, embora a fração líquida que compunha a receita, estar em ebulição por 1 min. NUANUALSUWAN e CLIVER (2003) constataram que o poliovírus, quando submetido à temperatura de 72°C, por 15 s, sofre redução de mais de 2 logs na sua capacidade infecciosa. A redução na infecciosidade do RV, nos ensaios realizados neste experimento, foi menor que 1 log, quando comparadas as amostras cruas com as cozidas por 1 min. Este fato demonstra que o RV possui maior resistência ao calor, quando comparado aos poliovírus. RAMOS et al. (2000) constatou que o RV porcino, estocado em fezes de porco à 10°C, pode permanecer infeccioso por

um período superior a trinta e dois meses. Outro estudo, realizado com RV humanos, armazenados em fezes humanas, relatou que mesmo quando submetidos à temperatura ambientes maiores que 30°C, estes vírus apresentaram-se infecciosos por período superior a dois meses, quando testados em cultura celular *in vitro*, utilizando-se células MA 104 (FISCHER et al. 2002).

A temperatura média nos tecidos dos mexilhões após 3 min de cozimento foi de 86°C, 5°C superior ao obtido após 1 min de cozimento. Esse aumento de temperatura promoveu grande diminuição na detecção de RV infecciosos (em duas das quatro repetições), mas não foi suficiente para ocasionar a redução significativa em cópias genômicas, pois mesmo com um capsídeo defeutivo, o genoma viral permaneceu protegido por esta estrutura. Estes resultados reforçam dados já obtidos em outros trabalhos onde exaltam a maior resistência do genoma viral, quando comparado à viabilidade da partícula viral, i.e., a capacidade de infectar uma célula (BERTRAND et al. 2012). Num ensaio de inativação do HAV, em homogenato de tecido de mexilhões, CROCI et al. (1999) constataram que após 3 min a 80°C, o HAV decaiu de 5,5 para 3,5 logs na sua infecciosidade. Quando comparado às amostras cruas, o decaimento da infecciosidade do RV após 3 min de cozimento, observado no corrente estudo, foi de aproximadamente 1 log, menor do que o observado no HAV, por CROCI et al. (1999). Além da diferença de 6°C, nas temperaturas avaliadas nestas duas pesquisas com mexilhões, as diferenças entre as matrizes amostrais, submetidas ao aquecimento (mexilhões inteiros e homogenato de tecido), também podem ter interferido nos resultados obtidos nos dois trabalhos.

Ao final de 5 min de cozimento, não havia RV infeccioso. Nessas amostras, ocorreu um decréscimo na quantidade de GC, de até 1 log quando comparado aos resultados obtidos após 3 min de cozimento.

As características da matriz amostral, tecido de mexilhão, pode ter influenciado grandemente a baixa inativação do RV pelo aumento da temperatura. BERTRAND et al. (2012) ressaltou em seu trabalho que, a inativação viral (GC ou PFU) difere de acordo com a complexidade da matriz amostral, sendo ela menor quanto mais complexa é a matriz. Como a carne de moluscos bivalves é considerada uma matriz complexa, por sua constituição, sendo rica em proteínas e gorduras, confere numa maior proteção das partículas

virais quanto submetidas ao aumento da temperatura (BERTRAND et al. 2012). Essa diferença na complexidade da matriz amostral, também foi observada por CROCI et al. (1999), ao comparar a inativação do HAV pelo aumento da temperatura, utilizando-se de suspensão viral ou de homogenato de tecidos de mexilhões inoculados com o vírus. Enquanto que o HAV era totalmente inativado a 80°C por 3 min, em suspensão viral, no homogenato de tecidos, este vírus permanecia infeccioso por 15 min, sob a mesma temperatura.

Associados à alta temperatura, os ingredientes que fizeram parte desta receita culinária, também podem ter influenciado na não inativação do RV, porém, seriam necessários mais estudos a fim de que fosse avaliado a influencia destes ingredientes no processo da inativação do RV. Além da complexidade da matriz onde as partículas virais estavam inseridas, particularidades deste vírus, como capsídeo com três camadas concêntricas e RNA de dupla fita também podem ter conferido maior resistência frente ao aumento da temperatura.

### 2.2.1. Conclusões

A forma de preparo da receita culinária avaliada, *Moules Marinières*, com rápido cozimento dos mexilhões, não elimina o risco de contaminação humana por RV. Embora o tempo de 3 min fosse suficiente para a abertura das valvas dos mexilhões, este fato não serve como parâmetro de que a temperatura interna do molusco está equiparada à externa (parte líquida do prato), já em estado de ebulição. Seria necessário maior tempo de exposição às temperaturas testadas para que houvesse completa inativação viral. Existem poucos estudos sobre RV em mexilhões, como também sobre a inativação desses vírus nos tecidos dos moluscos bivalves.

### Referências do Apêndice A

- ARIAS, C. F., P. ROMERO, V. ALVAREZ, et al. (1996). Trypsin activation pathway of Rotavirus infectivity. **Journal of Virology** 70(9): 5832-5839.
- ARNOLD, M., J. T. PATTON and S. M. MCDONALD (2009). Culturing, Storage, and Quantification of Rotaviruses. **Culturing, storage, and quantification of Rotaviruses** Unit-15C(3).

- BERTRAND, I., J. F. SCHIJVEN, G. SÁNCHEZ, et al. (2012). The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. **Journal of Applied Microbiology** 112(6): 1059-1074.
- CHOI, J. M., A. M. HUTSON, M. K. ESTES, et al. (2008). Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 105: 9175-9180.
- CROCI, L., M. CICOZZI, D. D. MEDICI, et al. (1999). Inactivation of Hepatitis A virus in heat-treated mussels. **Journal of Applied Microbiology** 87: 884-888.
- DONALDSON, E. F., L. C. LINDESMITH, A. D. LOBUE, et al. (2010). Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. **Nature Reviews Microbiology** 8: 231-241.
- FISCHER, T. K., H. STEINSLAND and P. VALENTINER-BRANTH (2002). Rotavirus particles can survive storage in ambient tropical temperatures for more than 2 months **Journal of Clinical Microbiology** 40(12): 4763-4764.
- GRODZKI, M., J. OLLIVIER, J.-C. L. SAUX, et al. (2012). Impact of Xynthia Tempest on viral contamination of shellfish. **Applied and Environmental Microbiology** 78(9): 3508-3511.
- HARAMOTO, E., H. KATAYAMA, K. OGUMA, et al. (2006). Seasonal profiles of human noroviruses and indicator bacteria in a wastewater treatment plant in Tokyo, Japan. **Water Science and Technology** 54(11-12): 301-308.
- HUANG, P., T. FARKAS, W. ZHONG, et al. (2005). Norovirus and Histo-Blood Group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. **Journal of Virology** 79: 6714-6722.
- LA ROSA, G., M. IACONELLI, M. POURSHABAN, et al. (2010). Detection and molecular characterization of noroviruses from five sewage treatment plants in central Italy. **Water Research** 44: 1777-17784.
- LE GUYADER, F. S., R. L. ATMAR and J. L. PENDU (2012). Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play. **Current Opinion in Virology** 2: 103-110.

- LE GUYADER, F. S., J.-C. LE SAUX, K. AMBERT-BALAY, et al. (2008). Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a french oyster-related gastroenteritis outbreak. **Journal of Clinical Microbiology** 46(12): 4011-4017.
- LE GUYADER, F. S., S. PARNAUDEAU, J. SCHAEFFER, et al. (2009). Detection and Quantification of Noroviruses in Shellfish. **Applied and Environmental Microbiology** 75(3): 618–624.
- LINDESMITH, L. C., E. F. DONALDSON and R. S. BARIC (2011). Norovirus GII.4 strain antigenic variation. **Journal of Virology** 85(1): 231-242.
- LTC. (2012, 14/11/2012). Mengo Extraction Control. **CeeramTools** Retrieved 11/02/2014, 2014, from [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/Mengo\\_Virus\\_Protocol\\_4475931.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/Mengo_Virus_Protocol_4475931.pdf).
- MAALOUF, H., M. ZAKHOUR, J. L. PENDU, et al. (2010). Distribution in tissue and seasonal variation of Norovirus genogroup I and II ligands in oysters. **Applied and Environmental Microbiology** 76(16).
- NUANUALSUWAN, S. and D. O. CLIVER (2003). Infectivity of RNA from inactivated Poliovirus. **Applied and Environmental Microbiology** 69(3).
- OKA, T., K. KATAYAMA, G. S. HANSMAN, et al. (2006). Detection of human Sapovirus by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. **Journal of Medical Virology** 78: 1347-1353.
- PANG, X. L., B. LEE, N. BOROUMAND, et al. (2004). Increased detection of Rotavirus using a Real Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea. **Journal of Medical Virology** 72: 496-501.
- PINTÓ, R. M., M. I. COSTAFREDA and A. BOSCH (2009). Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of Hepatitis A. **Applied and Environmental Microbiology** 75(23): 7350-7355.
- RAMOS, A. P., C. C. STEFANELLI, R. E. LINHARES, et al. (2000). The stability of porcine rotavirus in feces. **Veterinary Microbiology** 71(1-2): 1-8.

- SHIRATO-HORIKOSHI, H., S. OGAWA, T. WAKITA, et al. (2007). Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. **Archives of Virology** 152: 457-461.
- SILVA, A. K. D., J.-C. L. SAUX, S. PARNAUDEAU, et al. (2007). Evaluation of removal of Noroviruses during wastewater treatment, using Real-Time Reverse Transcription-PCR: different behaviors of Genogroups I and II. **Applied and Environmental Microbiology** 73(24): 7891-7897.
- XERRY, J., C. I. GALLIMORE, M. ITURRIZA-GÓMARA, et al. (2010). Genetic characterization of Genogroup I Norovirus in outbreaks of gastroenteritis. **Journal of Clinical Microbiology** 48(7): 2560-2562.
- ZHENG, D. P., T. ANDO, R. L. FANKHAUSER, et al. (2006). Norovirus classification and proposed strain nomenclature. **Virology** 346: 312-323.


**Apêndice B- Artigo publicado com os resultados do Capítulo I da Tese**

Author's personal copy

Ecotoxicology and Environmental Safety 76 (2012) 153–161


---

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect



## Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ecoenv](http://www.elsevier.com/locate/ecoenv)



---

**Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters**

Doris Sobral Marques Souza<sup>a</sup>, Ana Paula Dores Ramos<sup>a</sup>, Fabrício Flores Nunes<sup>d</sup>, Vanessa Moresco<sup>a</sup>, Satie Taniguchi<sup>b</sup>, Diego Averaldo Guiguet Leal<sup>c</sup>, Silvio Tarou Sasaki<sup>b</sup>, Márcia Caruso Bicego<sup>b</sup>, Rosalinda Carmela Montone<sup>b</sup>, Maurício Durigan<sup>c</sup>, Adriano Luiz Teixeira<sup>a</sup>, Mariana Rangel Pilotto<sup>a</sup>, Nicésio Delfino<sup>a</sup>, Regina Maura Bueno Franco<sup>c</sup>, Cláudio Manoel Rodrigues de Melo<sup>e</sup>, Afonso Celso Dias Bainy<sup>d</sup>, Célia Regina Monte Barardi<sup>a\*</sup>

## Apêndice C – Laudo das Análises Viroológicas concedido aos restaurantes



Universidade Federal de Santa Catarina  
 Centro de Ciências Biológicas  
 Departamento de Microbiologia e Parasitologia  
 Laboratório de Virologia Aplicada



### LAUDO

#### ANÁLISE VIROLÓGICA DE OSTRAS DEPURADAS:

##### Procedência da amostra

**Município:** Florianópolis

**Localidade:** Rod. Rafael Rocha Pires, 2759, Sambaqui

**Produtor:** Restinga Recanto Bar e Restaurante

**Amostragem:** Amostra indicativa - 1 dúzia de ostras depuradas por 96 horas (depuradora modelo BWA SC-2, Lâmpada U.V., com dosagem de 44 mJ/cm<sup>2</sup> por passagem pela UV).

##### Resultados das análises virais nas amostras de ostras depuradas

Data da Coleta	Adenovirus Humano	Virus da Hepatite A	Pollomavirus JC	Norovirus Humano GI	Norovirus Humano e GII
25/11/11	ND	ND	ND	ND	ND
29/02/12	ND	ND	ND	ND	ND

ND= não detectado

A análise virológica das amostras de ostras depuradas obedeceu ao seguinte protocolo básico: Uma amostra indicativa de ostras, 12 animais, foi dissecada sendo utilizadas somente as glândulas digestivas destes animais para a realização das análises virais, a fim de minimizar inibidores da reação de amplificação. As glândulas digestivas das ostras foram homogeneizadas e as partículas virais separadas dos seus tecidos, através da técnica de eluição padronizada por Lewis & Metcalf, com pequenas modificações, segundo Rigotto et al., 2010. Depois de realizada a extração dos ácidos nucleicos virais através do Kit comercial Qiagen® (QIAmp MinElute Virus Spin), as amostras foram submetidas à amplificação dos genomas virais (análise em duplicata), por meio de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) para cada um dos vírus pesquisados, com metodologias já previamente padronizadas (Herroth et al., 2002, Kageyama et al., 2003, Jothikumar et al., 2005 e Pal et al., 2006).

##### REFERÊNCIAS:

- Lewis, G. D. and Metcalf, T. G. (1988) Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1963–1968.
- Rigotto, C., Victoria, M., Moresco, V., Kolesnikovas, C.K., Correa, A.A., Souza, D.S.M., Miagostovich, M.P., Simões, C.M.O., Barardi, C.R.M., 2010. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianópolis, South Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 1-9.

Campus Universitário - Trindade - Florianópolis/SC

CEP: 88040-900

Fone: (48) 3331 5207 / 3331 9049

Fax: (48) 3331 9258

Dr<sup>a</sup>. Célia Regina Monte Barardi - [cbarardi@ccb.ufsc.br](mailto:cbarardi@ccb.ufsc.br)

Dr<sup>a</sup> Cláudia Maria Oliveira Simões - [claudias@reitoria.ufsc.br](mailto:claudias@reitoria.ufsc.br)





**Universidade Federal de Santa Catarina**  
**Centro de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Microbiologia e Parasitologia**  
**Laboratório de Virologia Aplicada**



Herroth, B. E., Conden-Hansson, A.C, Rehnstam-Holm, A.S., Girones, R., Allard, A.K., 2002. Environmental Factors Influencing Human Viral Pathogens and Their Potential Indicator Organisms in the Blue Mussel, *Mytilus edulis*: the First Scandinavian Report. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (9), 4523–4533.

Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, T., Katayama, K., 2003. Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 1548–1557.

Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Sobsey, M.D., Robertson, B.H., 2005. Development and Evaluation of a Broadly Reactive TaqMan Assay for Rapid Detection of Hepatitis A Virus. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 3359–3363.

Pal, A., Sirota, L., Maudru, T., Peden, K., Lewis Jr, A.M., 2006. Real-time, quantitative PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. *Journal of Virological Methods* 135, 32–42.

Florianópolis, 03 de maio de 2012.

*Célia Regina Monke Barardi*<sup>o</sup>

Dr<sup>a</sup> Célia R. M. Barardi  
 Responsável pelo Laboratório

*Doris Sobral Marques*

Doris Sobral Marques Souza  
 Responsável pelas Análises

**Apêndice D – Artigo publicado com os resultados do Capítulo II da Tese**

International Journal of Food Microbiology 167 (2013) 337–345

---



ELSEVIER


Contents lists available at ScienceDirect

**International Journal of Food Microbiology**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro)




---

**Virus, protozoa and organic compounds decay in depurated oysters**  CrossMark

Doris Sobral Marques Souza <sup>a,\*</sup>, Rômi Sharon Piazza <sup>d,1</sup>, Mariana Rangel Pilotto <sup>a</sup>,  
 Mariana de Almeida do Nascimento <sup>a</sup>, Vanessa Moresco <sup>a</sup>, Satie Taniguchi <sup>b,2</sup>, Diego Averaldo Guiguet Leal <sup>c,3</sup>,  
 Éder Carlos Schmidt <sup>e,4</sup>, Eduardo Cargin-Ferreira <sup>f</sup>, Márcia Caruso Bicego <sup>b,2</sup>, Silvio Tarou Sasaki <sup>b,2</sup>,  
 Rosalinda Carmela Montone <sup>b,2</sup>, Rafael Alves de Araujo <sup>g,5</sup>, Regina Maura Bueno Franco <sup>c,3</sup>,  
 Zenilda Laurita Bouzon <sup>e,4</sup>, Afonso Celso Dias Bainy <sup>d,1</sup>, Célia Regina Monte Barardi <sup>a,6</sup>

**Apêndice E – Co-autoria em Trabalhos Publicados, ou aceitos para publicação, em decorrência de parcerias estabelecidas**

**Artigos:**

Journal of Applied Microbiology 

Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072

ORIGINAL ARTICLE


**Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianópolis, South Brazil**

C. Rigotto<sup>1</sup>, M. Victoria<sup>2</sup>, V. Moresco<sup>1</sup>, C.K. Kolesnikovas<sup>1</sup>, A.A. Corrêa<sup>1</sup>, D.S.M. Souza<sup>1</sup>, M.P. Miagostovich<sup>2</sup>, C.M.O. Simões<sup>1</sup> and C.R.M. Barardi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Virologia Aplicada, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, Santa Catarina State, Brazil  
<sup>2</sup> Laboratório de Virologia Comparada, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro RJ, Brazil

Marine Pollution Bulletin 64 (2012) 40–48

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Marine Pollution Bulletin

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/marpolbul](http://www.elsevier.com/locate/marpolbul)

**Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil**

V. Moresco, A. Viancelli, M.A. Nascimento, D.S.M. Souza, A.P.D. Ramos, L.A.T. Garcia, C.M.O. Simões, C.R.M. Barardi\*

Laboratório de Virologia Aplicada, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina State, CEP 88040-900, Brazil

Journal of Applied Microbiology 

Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072

ORIGINAL ARTICLE

**Stability of human enteric viruses in seawater samples from mollusc depuration tanks coupled with ultraviolet irradiation**

A. de Abreu Corrêa, D.S.M. Souza, V. Moresco, C.R. Kleemann, L.A.T. Garcia and C.R.M. Barardi

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, UFSC, Florianópolis, Brazil



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Ocean &amp; Coastal Management

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ocecoaman](http://www.elsevier.com/locate/ocecoaman)

## Sanitary quality of edible bivalve mollusks in Southeastern Brazil using an UV based depuration system

Averaldo G. Leal Diego<sup>a,\*</sup>, Ana Paula Dores Ramos<sup>b</sup>, Dóris Sobral Marques Souza<sup>b</sup>, Maurício Durigan<sup>c</sup>, Juliane Araújo Greinert-Goulart<sup>a,1</sup>, Vanessa Moresco<sup>b</sup>, Rahel Céline Amstutz<sup>c</sup>, Alexandre Hein Micoli<sup>d</sup>, Romeu Cantusio Neto<sup>d</sup>, Célia Regina Monte Barardi<sup>b</sup>, Regina Maura Bueno Franco<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup> Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Laboratório de Protocologia, Rua Monteiro Lobato N° 255, Campinas, São Paulo, PO Box 6109, CEP 13083-970, Brazil

<sup>b</sup> Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Virologia Aplicada, Florianópolis, Santa Catarina, CEP 88040-970, Brazil

<sup>c</sup> Université de Lausanne, Faculté de Biologie et Médecine, Lausanne, Switzerland

<sup>d</sup> Sociedade de Abastecimento de Águas e Saneamento, Laboratório de Microbiologia, Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>\*</sup> Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Laboratório de Análise Genética e Molecular, Brazil



International Journal of Environmental Science and  
Engineering Research (IJESER)

[www.journal-ijeser.com](http://www.journal-ijeser.com)

ISSN: 0976-3708 (print)

IJESER Vol 3(3):62-79, 2012

## Monitoring viruses in environmental samples

C.R.M. Barardi<sup>1,\*</sup>, A. Viancelli<sup>2</sup>, C. Rigotto<sup>3</sup>, A.A. Corrêa<sup>4</sup>,  
V. Moresco<sup>1</sup>, D.S.M. Souza<sup>1</sup>, M. E. I. ElMahdy<sup>1</sup>,  
G. Fongaro<sup>1</sup>, M.R. Pilotto<sup>1</sup>, M. A. Nascimento<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade 88040-900, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil  
<sup>2</sup> Empresa Sinos e Aves, 89700-000 Concórdia, Santa Catarina, Brasil

<sup>3</sup> Laboratório de Microbiologia Molecular Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental Universidade Feevale, Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>4</sup> Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, 24210-001, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil

**Capítulo de livro:**

- iConceptBook. iConcept Press Ltd.

**Molecular and Cell Culture Methods for evaluation of Viral Contamination in Environmental Samples Using Human Adenoviruses as Model**

Gislaine Fongaro

*Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.  
Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil*

Vanessa Moresco

*Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.  
Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil*

Lucas Ariel Totaro Garcia

*Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.  
Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil*

Elmahdy Mohamed Elmahdy

*Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.  
Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil*

Doris Sobral Marques Souza

*Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.  
Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil*

Mariana de Almeida do Nascimento

*Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.  
Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil*

Mariana Rangel Pilotto

*Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.  
Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil*

Célia Regina Monte Barardi

*Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.  
Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil*



## Anexos

*Anexo A – Parte do Documento nº 247, produzido após o Workshop organizado pela EPAGRI, com a participação do LVA-UFSC, como colaborador externo.*

DOCUMENTOS Nº 247

ISSN 0100-8986

Abril/2014

# Moluscos bivalves

Medidas de controle microbiológico  
para atender às exigências da União Europeia



Governo do Estado de Santa Catarina  
Secretaria de Estado da Agricultura e da Pesca  
Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural  
de Santa Catarina



Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri)  
Rodovia Admar Gonzaga, 1347, Itacorubi, Caixa Postal 502  
88034-901 Florianópolis, SC, Brasil  
Fone: (48) 3665-5000, fax: (48) 3665-5010  
Site: www.epagri.sc.gov.br

Editado pela Epagri/Gerência de Marketing e Comunicação (GMC).

Colaboradores da Epagri:

André Luis Tortato Novaes  
Fabiano Müller Silva  
Luis Hamilton Pospissil Garbossa

Colaboradores externos:

Célia Regina Monte Barardi – UFSC  
Cleide Rosana Werneck Vieira – UFSC  
Eduardo de Azevedo Pedrosa Cunha – MPA  
Pedro Mansur Sesterhenn – Cidasc  
Cristhiane Stecanella de Oliveira Cattani – Mapa

Revisão e padronização: João Batista Leonel Ghizoni

Primeira edição (*online*): abr. 2014

É permitida a reprodução parcial deste trabalho desde que citada a fonte.

#### Ficha catalográfica

SOUZA, R.V. de; RUPP, G.S.; CAMPOS, C.J.A. de;  
LEE, R. *Moluscos bivalves*: medidas de controle  
microbiológico para atender às exigências da  
União Europeia. Florianópolis: Epagri, 2014, 48p.  
(Epagri. Documentos, 247).

Molusco bivalve; Controle biológico.

ISSN 0100-8986

○