

Daiane Mara Bobermin

**AVALIAÇÃO DE SISTEMA COMPACTO PARA
DEPURAÇÃO DE OSTRAS (*CRASSOSTREA GIGAS*)
CONTAMINADAS COM *ESCHERICHIA COLI***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Mestre em Ciência dos Alimentos

Orientador: Profa. Dra. Cleide Rosana Werneck Vieira

Florianópolis

2013

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

Bobermin, Daiane Mara

Avaliação de sistema compacto para depuração de ostras
(*Crassostrea gigas*) contaminadas com *Escherichia coli* /
Daiane Mara Bobermin ; orientadora, Cleide Rosana Werneck
Vieira - Florianópolis, SC, 2013.

78 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Microbiologia. 3. Ciência
dos Alimentos. 4. Depuração. I. Vieira, Cleide Rosana
Werneck. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III.
Título.

**AVALIAÇÃO DE SISTEMA COMPACTO PARA
DEPURAÇÃO DE OSTRAS (*CRASSOSTREA GIGAS*)
CONTAMINADAS COM *ESCHERICHIA COLI***

Por

Daiane Mara Bobermin

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciência dos Alimentos” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 13 de setembro de 2013.

Prof^ª. Dr^ª. Roseane Fett
Coordenador

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Cleide Rosana Wernek Vieira
Orientadora (UFSC)

Prof^ª. Dr^ª. Roberta Juliano Ramos
Membro (Faculdade Estácio de Sá)

Prof. Dr. Juliano De Dea Lindner
Membro (UFSC)

Dr. Felipe Matarazzo Suplicy
Membro (Marine Equipment LDTA.)

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Cleide Rosana Werneck Vieira, pela oportunidade proporcionada.

À Empresa Marine Equipments Ltda. e ao Drº Felipe Matarazzo Suplicy, pelo financiamento e por todo auxílio durante a realização dos experimentos.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pelo incentivo a qualificação e, em especial ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos e a todos os servidores do Centro de Ciências Agrárias que contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente ao Bento, Carlos e Sérgio.

Aos colegas de trabalho do laboratório de extensão de Microbiologia de Alimentos, principalmente à Dona Miriam, pelos inúmeros conselhos e às estagiárias Larissa e Rhaysa, pela amizade e pelo convívio durante esse período.

A todos os amigos, Gisele, Patricia, Joseana, Bianca, Marília, Helen, Karin, Eunice, pela ajuda e pelo apoio para que eu conseguisse o título de Mestre.

A minha família que, mesmo estando longe, sempre torceu pelo meu sucesso.

RESUMO

O consumo de frutos do mar vem crescendo no mundo inteiro nos últimos anos e, acompanhando esse crescimento, vem aumentando também os casos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) relacionadas ao consumo de frutos do mar. Nesse cenário, as ostras são um problema ainda maior, devido à forma como obtém seu alimento, filtrando a água do mar e consequentemente concentrando os micro-organismos nela presentes. A fim de minimizar os riscos associados ao consumo de bivalves, várias medidas foram tomadas pelas autoridades competentes visando regulamentar as áreas de cultivo. De acordo com o proposto pela Instrução Normativa Interministerial No 7, de 8 de maio de 2012, vigente no Brasil, as áreas de cultivo são classificadas de acordo com a quantidade de *Escherichia coli* presente em 100g da carne dos moluscos em 3 categorias, sendo que a categoria intermediária (concentração de *E. coli* ≥ 230 e < 46000 NMP em 100g da carne dos moluscos) só pode ser comercializada se passar por um processo de descontaminação. Nesse sentido, a depuração se apresenta como uma alternativa viável para reduzir a quantidade de micro-organismos sem provocar alterações que impeçam o consumo *in natura* das ostras. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o processo de depuração por luz UV em ostras *Crassostrea gigas* contaminadas com *E. coli*. Para isso, as ostras foram coletadas em Santo Antônio de Lisboa, Florianópolis, Santa Catarina e levadas ao laboratório de microbiologia de alimentos, onde foram contaminadas com *Escherichia Coli*. Posteriormente as amostras foram submetidas ao processo de depuração e se realizou a enumeração de *E. coli* nos tempos de 0, 12, 18, 24, 36 e 48h. Após as 48h, houve redução estatisticamente significativa da quantidade de *E. coli* em todas as repetições testadas, com $p < 0,001$, mostrando a eficácia da depuração nas condições deste trabalho. Nas repetições em que o inóculo foi ≥ 230 e < 46000 NMP em 100g de carne do molusco, a redução de *E. coli* ao final

das 48h ficou de acordo com o limite estabelecido para consumo *in natura* (<230 NMP/100g de carne).

Palavras-chave: *Crassostrea gigas*, *Escherichia coli*, Depuração.

ABSTRACT

The consumption of seafood has been rising in recent years and accompanying this growth also increased cases of foodborne illness related to the consumption of seafood. Considering this, oysters and another shellfish are an even bigger problem because during their natural feeding process, they are able to filter large quantities of water, retaining and concentrating in their bodies bacteria and viroses that are presents in the environment. To minimize the risks associated with the consumption of shellfish, several measures were taken in order to regulate the cultivation areas. In accordance with current legislation in Brazil (IN 07, May, 8, 2012), the growing areas are classified according to the amount of *E. coli* present in 100 g of mollusc meat into 3 categories. The intermediate category (between 230 – 46000 MNP in 100g of meat) are able to be consumed after through a decontamination process. The oysters were collected in Santo Antonio de Lisboa , Florianópolis , Santa Catarina and brought at the food microbiology laboratory of the Federal University of Santa Catarina, where the samples were contaminated and submitted to the depuration process. The enumeration of *E coli* was done with 0, 12, 18, 24, 36 and 48 hours. After 48h , was observed a statistically significant reduction in the amount of *E. coli* in all replicates tested, with $p < 0.001$, showing the efficiency of purification in this study. In replicates witch the initial amount of *E. coli* was ≥ 230 and <46000 NMP in 100g of mollusc meat (range set by legislation as indicated to purification), the reduction of *E. col*, in the end of 48 hours, was in accordance with the limits established for consumption (< 230 NMP in 100g of mollusc meat).

Keywords: *Crassostrea gigas*, *Escherichia coli*, Depuration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura interna da ostra	25
Figura 2 Ciclo de vida natural da <i>Crassostreas gigas</i>	26
Figura 3 Produção Global da Aquicultura de <i>C.gigas</i>	27
Figura 4 Principais produtores mundiais de <i>C. gigas</i>	27
Figura 5 Produção de pescado (t) nacional em 2009 e 2010 discriminada por Unidade da Federação	29
Figura 6 Evolução da produção de moluscos comercializados em Santa Catarina entre 1990 e 2012 (t).....	30
Figura 7 Número de surtos associados a frutos do mar confirmados e casos relacionados, por ano e agente etiológico nos EUA entre 1973 e 2006.....	46
Figura 8 Letalidade dos diferentes comprimentos de onda da luz UV	55
Figura 9 <i>Crassostrea gigas</i>	57
Figura 10 Ostras <i>C. gigas</i> em processo de depuração	60
Figura 11 Caldo CGM antes e depois da inoculação	61
Figura 12 Meio TBX positivo para identificação de <i>E. coli</i>	62
Figura 13 Concentração de <i>E. coli</i> em NMP/100g no início e ao final da depuração das repetições 1, 2, 3 e 4 respectivamente	65
Figura 14 Concentração de <i>E. coli</i> em NMP/g no início e ao final da depuração das repetições 5 e 6 respectivamente	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Produção de pescado da aquicultura marinha (em t) por Espécie	23
Tabela 2 Perigos associados ao consumo de moluscos Bivalves	40
Tabela 3 Micro-organismos causadores de doenças relacionadas ao consumo de bivalves	42
Tabela 4 Critérios para retirada de moluscos bivalves	50
Tabela 5 Tempos de depuração necessários para eliminação de 90% da carga de contaminação para diferentes microorganismos	52
Tabela 6 Valores de temperatura obtidos durante o processo de depuração	62
Tabela 7 Valores de NMP obtidos a cada ciclo de depuração.....	53
Tabela 8 Valores obtidos nas depurações com inóculo de maior concentração.....	64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Histórico	20
2.2 Produção Aquícola	22
2.3 <i>Crassostrea giga</i>	24
2.4 Sistemas de Cultivo	28
2.5 Produção de moluscos em Santa Catarina	28
2.6 Microbiologia de moluscos bivalves e doenças associada	31
2.6.1 Vírus	32
2.6.1.1 Norovírus	32
2.6.1.2 Vírus da Hepatite A (HAV)	33
2.6.2 Bactérias	34
2.6.2.1 Vibrios	34
2.6.2.2 <i>Salmonella</i>	35
2.6.2.3 <i>Aeromonas</i>	36
2.6.2.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	36
2.6.2.5 <i>Clostridium botulinum</i>	37
2.6.2.6 <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , e <i>Bacillus cereus</i>	38
2.6.3 Protozoários	39
2.7 Dados Epidemiológicos	39
2.8 <i>Escherichia coli</i> como indicador	46
2.9 Legislação	47
2.10 Sistemas de Depuração	51
2.11 UV Germicida	53
3. MATERIAL E MÉTODO	56
3.1 Obtenção das ostras	56
3.2 Obtenção da água salina	56
3.3 Parâmetros da água salina	57
3.4 Obtenção do inóculo	57
3.5 Contaminação das ostras	57
3.6 Depuração	57
3.7 Parâmetros da depuradora	58
3.8 Ensaios Microbiológicos	59
3.9 Método de Ensaio	59
3.10 Análises Estatísticas	61

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1 Parâmetros da água salina	62
4.1.1 pH.....	62
4.1.2 Temperatura	62
4.1.3 Oxigênio dissolvido	63
4.2 Ensaio Microbiológico.....	63
5. CONCLUSÕES	69
6. REFERÊNCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

O consumo de frutos do mar, que é um hábito mais comum em certos países, vem sofrendo um aumento a nível mundial, principalmente devido ao fato de estarem relacionados a uma vida mais saudável e à prevenção de doenças, como as cardiovasculares (VOULTSIADOU, 2009; BUTT, 2004; FAO, 2011). Dentre os frutos do mar, a malacocultura desempenha um importante papel, visto que a manutenção do seu cultivo não é muito onerosa se comparada com outras culturas (BRASIL, 2012; SOUZA-FILHO, 2003).

Nesse sentido, a criação de ostras e mexilhões vem adquirindo uma importância cada vez mais significativa. Hoje, no Brasil, o estado de Santa Catarina é responsável por aproximadamente 90% da produção nacional de ostras e mexilhões. Essa atividade se desenvolveu no estado em 1987 e, devido à geografia do litoral, as condições favoráveis ao cultivo e aos incentivos recebidos pela EPAGRI e UFSC, se expandiu e deixou de ser apenas uma atividade complementar praticada por pequenos pescadores para ser a atividade principal de renda de muitas famílias, gerando muitos empregos indiretos e lucro para o estado (FERREIRA & OLIVEIRA-NETO, 2007; BRASIL, 2012).

Devido ao fato de serem organismos filtradores, as ostras e mexilhões podem concentrar os micro-organismos presentes ou introduzidos no ambiente marinho. Esse fato deve ser considerado, uma vez que, principalmente no caso das ostras, esses animais são consumidos crus ou apenas parcialmente cozidos, o que não é suficiente para eliminar os riscos microbiológicos associados ao consumo (GOSLING, 2003; LEE & YOUNGER, 2002)

Historicamente, as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) são responsáveis por um grande número de hospitalizações e até mesmo algumas mortes no mundo inteiro, ainda que estas sejam, muitas vezes, subestimadas devido à falta de registros (BUTT, 2004; IWAMOTO, 2010; OLIVEIRA, 2011).

As patologias associadas ao consumo de moluscos podem ser de origem microbiológica, causadas por vírus, bactérias e protozoários, de origem química ou ainda em consequência de toxinas produzidas por algas (LEE, LOVATELLI & ABABOUCHE, 2008).

Como a quantidade de micro-organismos presentes em moluscos bivalves está relacionada com a água em que eles são cultivados, a resolução n. 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente estabelece o monitoramento das águas de cultivo através da avaliação dos níveis de coliformes termotolerantes ou de *Escherichia coli*. (CONAMA, 2005).

Porém, somente o monitoramento das águas muitas vezes não é suficiente, e em países da Europa a carne dos moluscos também é avaliada. No Brasil, o Ministério da Pesca e Agricultura instituiu o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB) a fim de monitorar a quantidade de micro-organismos e biotoxinas marinhas em moluscos bivalves e, através da Instrução Normativa Interministerial Nº 7, de 8 de maio de 2012, estabeleceu os limites microbiológicos para retirada de moluscos bivalves, classificando as áreas de cultivo como: liberada, liberada sob condição ou suspensa. Por essa classificação, áreas que apresentarem um valor menor que 230 NMP de *E.coli* em 100g de carne podem ter os moluscos retirados e destinados ao consumo sem nenhum tipo de tratamento. Áreas que apresentarem mais que 46000 NMP de *E.coli* em 100g de carne não podem ter os moluscos retirados e áreas com quantidades intermediárias a essas são passíveis de retirada desde que se realize algum processo para diminuir a contaminação a níveis aceitáveis (BRASIL, 2012).

Nesse sentido, a depuração se apresenta como uma alternativa válida, uma vez que não provoca alterações sensoriais que impossibilitem o consumo *in natura* dos moluscos. A depuração é um processo controlado, no qual os mariscos são colocados em água do mar tratada com agentes como o cloro, ozônio ou luz UV por algumas horas, a fim de reduzir os micro-organismos presentes nos seus tecidos através do processo natural

de filtração (RONG et al, 2013).

No entanto, é necessário investigar se a implantação desse processo de descontaminação realmente atende às necessidades pretendidas para cada caso. Sendo assim, este trabalho procurou avaliar a eficiência de um sistema de depuração compacto com luz ultravioleta na descontaminação de ostras (*Crassostrea gigas*) contaminadas com *Escherichia coli* durante um período de até 48h. Para isso, as ostras foram contaminadas no laboratório com *Escherichia coli* e foram transferidas para a depuradora, onde se deu início ao processo de descontaminação. Os ensaios foram realizados acordo com o método ISO/TS 6649-3:2005 e foi determinada a variação na concentração de *E. coli* com 0h, 12h, 18h, 24h, 36h e 48h de depuração.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico

Entende-se como aquicultura tudo o que é cultivado na água, incluindo peixes, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas, diferentemente da pesca extrativa, que apenas captura os produtos. Os cultivos podem ser tanto em águas salgadas (maricultura) com peixes, camarões, macroalgas e moluscos bivalves (ostras, mexilhões, vieiras), quanto em água doce (águas continentais), com peixes, rãs e camarões-de-água-doce (FAO, 2011). A aquicultura é uma prática antiga, Relatos de 500 a.C. já descrevem a criação de carpas para fins comerciais na China. A cultura de bivalves também já é conhecida e praticada há tempos, sendo encontrados relatos de cultivo na Grécia em 350 a.C e na Itália em 100 a.C.

No entanto, fazendas de ostras só começaram a existir em 1624, na Baía de Hiroshima, Japão (GOSLING, 2003)

A introdução de frutos do mar na alimentação humana também é uma prática muito comum há séculos. Na Idade Antiga, moluscos já eram coletados e seu consumo era associado ao tratamento e prevenção de doenças e seu uso já foi relatado em trabalhos por Aristóteles, Hipócrates e Gelen (VOULTSIADOU, 2009). Atualmente, estudos indicando uma associação inversa entre o consumo de frutos do mar e mortes por doenças cardíacas também tem contribuído para o aumento da ingesta desses produtos (MCMANUS, TAYLOR & NICHOLSON, 2009; KROMHOUT et al, 2012; ENGELL et al, 2013).

A produção aquícola mundial se ampliou desde a década de 80 e se tornará cada vez mais importante à medida que aumenta demanda por produtos marinhos e a pesca de captura atinge um platô ou declínio e população humana continue se expandindo (DUNHAM, 2011). Dados do ano de 2002 dos Estados Unidos mostraram que nesse mesmo ano, foram consumidos cerca de 2 bilhões de kg de frutos do mar no país,

uma elevação de 4,5kg por pessoa em 1970 para 7kg por pessoa em 2002 (BUTT, 2004).

Segundo Newkirk (1996), os estuários marinhos rasos estão entre os ecossistemas mais produtivos da terra, pois o oceano é um ecossistema rico nas mais variadas espécies e exerce um importante papel na cadeia alimentar. Além disso, os ecossistemas costeiros fornecem uma grande variedade de bens e serviços, que incluem a produção de plantas aquáticas e animais utilizados não somente para a alimentação, como também para utilização pelas indústrias de medicamentos e construção, além de proporcionarem a reciclagem de nutrientes e a filtragem de poluentes. Considerando esses fatores, valor global de ecossistemas costeiros foi estimado em 12.57 trilhões de dólares por ano (PRIMAVERA, 2006; FAO, 2011).

Em 2009, os peixes representaram 16,6% da contribuição de proteína animal na população mundial e 6,5% de toda proteína consumida (FAO, 2011). No entanto, reservas naturais de animais marinhos vêm desaparecendo em decorrência da exploração exacerbada dos recursos pesqueiros e da poluição, gerada pelas cidades próximas ao litoral. Como consequência disso, a prática da aquicultura se desenvolve cada dia mais e vem adquirindo importância em diversos países de vasto litoral como fornecedora de proteína animal. Dentre estes países, ocupam posição de destaque a China, Espanha, Nova Zelândia, Chile, Japão, Coreia, Itália e o Brasil (SOUZA-FILHO, 2003; FAO 2011). Países como Brasil, Chile, Equador e México produzem grandes quantidades de salmão, tilápias, camarões, trutas e moluscos, liderando a produção na América Latina e contribuindo para o desenvolvimento da aquicultura na região (FAO, 2011).

A aquicultura contribui atualmente com 50% da quantidade total de peixes consumida no mundo. Considerando que biomassa de peixes que podem ser produzidos por área de superfície é muito maior do que para os animais terrestres e sabendo que peixes e seus derivados representam uma valiosa fonte de proteínas e nutrientes essenciais para uma dieta equilibrada e saudável, a aquicultura pode ser a chave para

garantir o suprimento alimentar da população mundial no futuro (DUNHAM, 2011; FAO, 2011).

2.2. Produção Aquícola

A produção mundial de pescado (proveniente tanto da pesca extrativa quanto da aquicultura) atingiu aproximadamente 146 milhões de toneladas em 2009 e 142 milhões de toneladas em 2008. Os maiores produtores em 2009 foram a China, com aproximadamente 60,5 milhões de toneladas, a Indonésia, com 9,8 milhões de toneladas, a Índia, com 7,9 milhões de toneladas e o Peru, com cerca de 7 milhões de toneladas. O Brasil contribuiu com 1.240.813 t em 2009, representando 0,86% da produção mundial de pescado, apresentando um ligeiro aumento em relação a 2008, ocupando assim 18º lugar no ranking geral dos maiores produtores de pescado do mundo. Em relação à produção aquícola mundial de 2009, a China continua sendo o maior produtor, com aproximadamente 45,3 milhões de toneladas. A Indonésia e a Índia são o segundo e terceiro maiores produtores, com cerca de 4,7 milhões e 3,8 milhões de toneladas, respectivamente. Neste critério, o Brasil ocupa a 17ª posição no ranking mundial, com a produção de 415.649 t em 2009, caindo uma posição em relação a 2008 (BRASIL, 2010).

De acordo com a FAO, a produção aquícola brasileira teve início em 1968, quando foram reportadas menos de 0,5 t. Desde então, a aquicultura nacional tem mostrado um crescimento gradual, atingindo o pico de produção em 2003, com 273.268 t. Após uma pequena queda nos anos de 2004 e 2005, a produção retomou o crescimento, registrando os maiores valores em 2008, 2009 e 2010, com 365.367 t, 415.649 t e 479.398 t, respectivamente (BRASIL, 2010).

A produção aquícola pode ser tanto marinha como continental, sendo que, atualmente, a aquicultura marinha no Brasil pode ser dividida basicamente em dois tipos: a malacocultura, que se refere à produção de moluscos e; a carcinicultura, que se refere à produção de camarões marinhos. Em relação à malacocultura, a maior parte da produção é nacional

é baseada no cultivo de três espécies: o mexilhão, a ostra e a vieira. Em 2010, apenas a produção oriunda da mitilicultura (cultivo de mexilhões) apresentou um incremento, passando de 11.067 t em 2009 para 13.723 t em 2010, o que representou um acréscimo 24% na produção neste período. Em contrapartida, a produção de ostras e vieiras sofreu baixas em 2010, destacando-se a vieira que apresentou um decréscimo de 62,9% entre 2009 e 2010, como pode ser observado na Tabela 1 (BRASIL, 2012).

Tabela 1: Produção de pescado da aquicultura marinha (em t) por espécie (BRASIL, 2012).

Espécie e Tipo de Cultura	2008	2009	2010
TOTAL	83.358,0	78.296,0	85.058,0
MALACOCULTURA	13.107,0	13.107,0	15.636,2
Mexilhão	11.067,0	11.067,0	13.723,0
Ostra	2.025,0	2.025,0	1.908,0
Vieira	14,0	14,0	5,2
CARCINICULTURA	70.251,0	65.188,0	69.422,4
Camarão	70.251,0	65.188,0	69.422,4

O cultivo de moluscos já é praticado com sucesso em vários países. Na Europa, por exemplo, é uma indústria bem estabelecida e que é responsável pelo desenvolvimento de muitas áreas costeiras (PAILLARD, LEROUX & BORREGO, 2004).

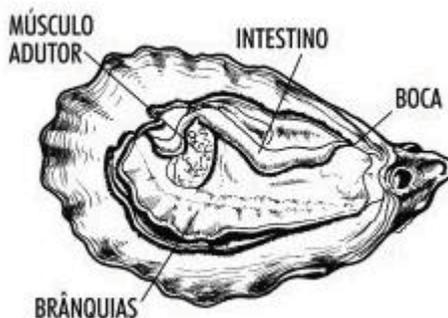
De acordo com a FAO, os moluscos ocupam o segundo lugar na produção da aquicultura mundial, representando 27% do total e ficando atrás somente do pescado de água doce, que ainda representa a maior parte da produção (54%). Cabe destacar que a maior parte dessa produção é proveniente da cultura de ostras, particularmente *Crassostrea gigas*. Do ponto de vista nutricional, estes animais possuem um conteúdo de proteína animal de alta qualidade, semelhante ao do leite e ovos, tornando-os um alimento nutritivo e um componente importante na dieta humana, principalmente em países onde os produtos aquáticos são a principal fonte de proteína (OLIVEIRA, 2011).

2.3 *Crassostrea gigas*

No Brasil, o cultivo de *C. gigas* iniciou-se em 1974, na cidade de Cabo Frio, Rio de Janeiro, quando o Instituto de Pesquisas Marinhas importou ostras da Grã-Bretanha. Em 1975, o cultivo iniciou-se em Cananéia, São Paulo e, em 1981, atingiu o nordeste do país. Em 1987, sementes oriundas do Instituto de Pesquisas Marinhas do Cabo Frio foram introduzidas no litoral de Santa Catarina, onde se adaptaram bem. Posteriormente, o estado de Santa Catarina também começou a produzir suas próprias sementes, através do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (FERREIRA & OLIVEIRA-NETO, 2007).

A espécie *Crassostrea gigas*, também chamada de ostra japonesa ou ostra do pacífico, pertence ao filo *molusca*, classe *bivalvia*, ordem *ostreoida*, família *ostreidae*. Como todos os representantes do grupo dos moluscos, apresenta o corpo dividido em três partes principais: cabeça, pé e manto. O comprimento máximo dos adultos é de 30 cm (algumas podem atingir 40 cm), mas, em média é de 8-15 cm. Encontra-se em águas de pouca profundidade, fixando-se, através do biso, em materiais fixos e sólidos. Os moluscos bivalves possuem o corpo protegido por uma concha calcária, formada por duas valvas articuladas unidas por ligamentos e músculos adutores, que permitem a abertura e fechamento da concha (Figura 1) (PAREJO, 1989) (FAO, 2011).

Figura 1: Estrutura interna da ostra (VALENTE, 2012).

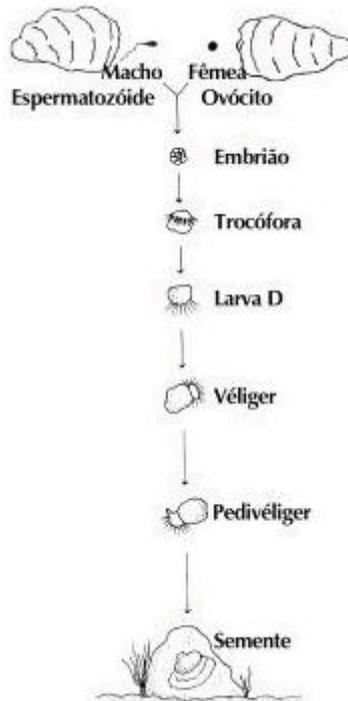


As ostras obtêm seu alimento pelo processo de filtração, através do trato ciliar das brânquias, que retêm as partículas em suspensão trazidas pela água (GOSLING, 2003).

O ciclo de vida natural de uma ostra compreende várias fases (Figura 2). Ostras adultas (machos e fêmeas) liberam seus gametas na água e dessa fecundação nasce uma larva que nada livremente até atingir o estágio de pedivéliger, no qual se forma um pé através do qual a larva irá se fixar ao substrato. Uma vez fixa, a ostra viverá aí por toda a vida, se isso ocorrer em ambiente natural (VALENTE, 2012). A desova é dependente da temperatura da água e só ocorre quando esta se encontra acima de 20°C e mais raramente entre 15-18°C. A salinidade é um fator importante para gametogênese, a qual ocorre entre 15-32‰ e dificilmente se completa em salinidades maiores.

Ostras adultas são hermafroditas, maturando normalmente primeiro como machos, podendo alternar de sexo durante seu ciclo de vida. Em zonas com boa disponibilidade de alimentos, as fêmeas dominam a população, podendo voltar a serem machos caso o alimento fique escasso (FAO, 2011).

Figura 2: Ciclo de vida natural da *Crassostrea gigas* (VALENTE, 2012).



Originalmente encontrada no Japão, China e Coréia, é a espécie mais comumente introduzida para cultivo no mundo e hoje encontra-se presente também na América, Austrália, Europa e África (Figuras 3 e 4). Isso se deve ao seu rápido crescimento e grande tolerância às condições ambientais. Foi reportado que fazendas de ostras já realizaram 168 introduções de 18 diferentes espécies de ostra em 73 diferentes regiões, e a *Crassostrea gigas* compreende 39% desse total (66 introduções). (MCKINDSEY, 2007; MELO, 2009; FAO, 2011).

Figura 3: Produção Global da Aquicultura de *Crassostrea gigas* (FAO, 2011).

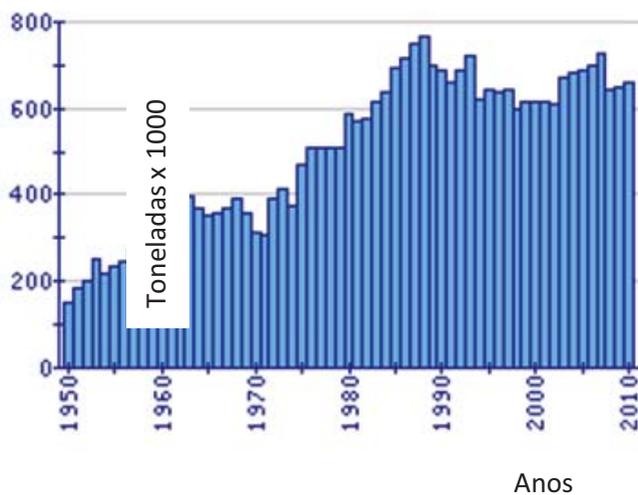


Figura 4: Principais produtores mundiais de *Crassostrea gigas* (FAO, 2006).



2.4 Sistemas de Cultivo

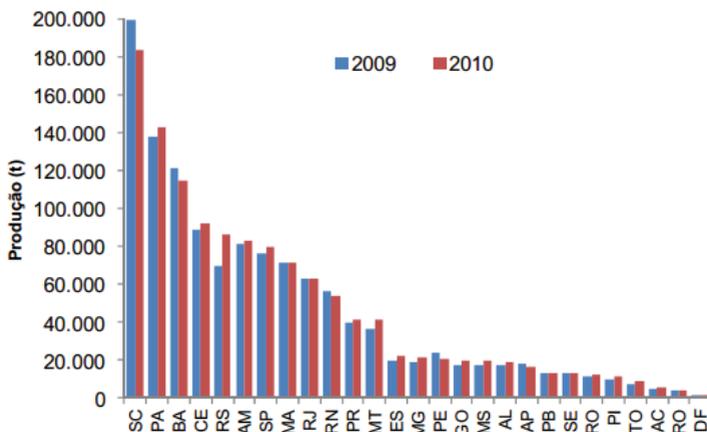
Os sistemas de cultivo de ostras podem ser de fundo ou suspensos, sendo que os cultivos suspensos podem ser fixos (mesa) ou flutuantes (espinhel ou *longline* e balsa). Estes são escolhidos conforme as condições do local, considerando a profundidade, ação das correntes, ondas e ventos. O cultivo de fundo não é realizado no Brasil, apenas em países europeus e da América do Norte, enquanto o cultivo suspenso é o sistema mais empregado no mundo (RAMOS, 2012; VALENTE, 2012).

No Brasil, três sistemas de cultivo são possíveis: o cultivo em balsa, em mesa ou do tipo *longline*, sendo o último o mais utilizado atualmente em diversos lugares e o mais recomendado para locais mais profundos e expostos, sujeitos à ação de ventos e correntes. (NEEMA, 2008)

2.5. Produção de moluscos em Santa Catarina

Atualmente, o Estado de Santa Catarina é o maior polo produtor de pescado do Brasil, com 183.770 t, como pode ser observado na figura 5 (BRASIL, 2010). Essa liderança nacional se deve principalmente ao cultivo de ostras e mexilhões, uma prática bem difundida no estado.

Figura 5: Produção de pescado (t) nacional em 2009 e 2010 discriminada por Unidade da Federação (BRASIL, 2010).



O cultivo de ostras no litoral de Santa Catarina começou como uma alternativa à atividade pesqueira artesanal até se tornar uma importante fonte de renda. A prática da ostreicultura vem crescendo cada vez mais e Santa Catarina ocupa hoje a liderança nacional na produção de ostras (cerca de 90% da produção nacional), ficando na frente dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo, tradicionais produtores (SOUZA-FILHO, 2003). A produção de ostras é uma atividade que gera trabalho, renda, emprego e imposto e é, para alguns municípios, a principal em importância econômica. Isso tem possibilitado a integração entre cultivo, turismo e gastronomia que revitalizou algumas localidades no estado (FERREIRA & OLIVEIRA-NETO, 2007).

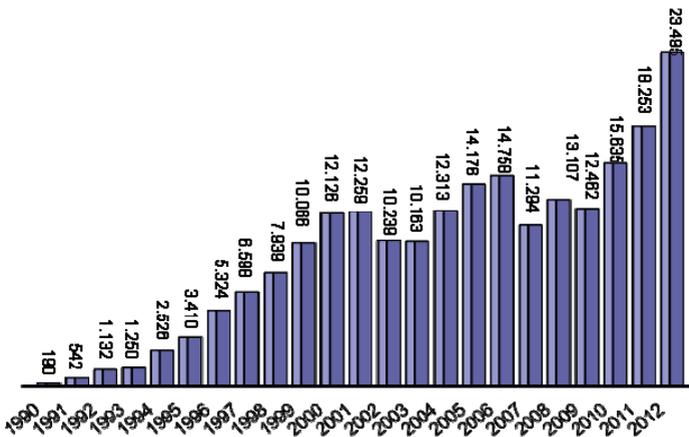
Em Santa Catarina, os cultivos são realizados próximos à costa, em baías e enseadas abrigadas, com alta concentração de matéria total particulada, fundo areno-lodoso, profundidade de 3 a 10 m, temperatura de 16-30°C e salinidade de 30 a 36‰. Devido às características dos ambientes de cultivo, as espécies e ao padrão artesanal dos produtores, utilizam-se principalmente os

sistemas de cultivo do tipo suspenso fixo do tipo “varal”, sistema flutuante do tipo espinhel ou *longline* e sistema flutuante do tipo balsa (SUPLICY, 2003; FERREIRA e MAGALHAES, 2004).

O estado ainda tem o malacocultura altamente favorecida devido à geografia do litoral catarinense, que proporciona inúmeras áreas protegidas para o cultivo, graças à presença de inúmeras baías, enseadas, estuário, sacos e angras (COELHO, 2003). A região produtora no estado se estende desde a costa norte até a costa centro-leste, compreendendo 12 municípios entre São Francisco do Sul e Palhoça, envolvendo aproximadamente 657 maricultores os quais são representados por 20 associações municipais, 1 estadual, 1 cooperativa e 2 federações (SANTOS, 2012).

Segundo dados da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), em 2012 foram produzidos 23.495 toneladas de moluscos (ostras, mexilhões e vieiras) no estado de Santa Catarina, representando um aumento de 28,71% em relação ao ano de 2011 (Figura 6).

Figura 6: Evolução da produção de moluscos comercializados em Santa Catarina entre 1990 e 2012 (t) (SANTOS, 2013).



A comercialização de mexilhões (*Perna perna*) registrou, em 2012, um aumento de 31,7% em relação a 2011, atingindo 21.027 t, com a produção concentrada principalmente nos municípios de Palhoça (13.753 t), Penha (2.930 t), Bombinhas (1.408 t) e Florianópolis (1.303 t).

A comercialização de ostras (*Crassostrea gigas*) registrou um aumento de 8% em relação à safra de 2011, chegando a 2.468 t em 2012, observando-se ainda um aumento no número total de ostreicultores, que passou de 127, em 2011, para 134 em 2012. As principais localidades responsáveis pela produção de ostras no estado no ano de 2012 foram os municípios de Florianópolis (1.887 t), São José (256 t), Palhoça (202 t), Biguaçu (17 t) e Governador Celso Ramos (17 t)

A comercialização de vieiras (*Nodipecten nodosus*), que havia sofrido uma queda de 26,9% em 2011, aumentou em 2012, registrando uma produção de 5,6 t. Os municípios responsáveis pela produção de vieiras em 2012 foram Penha (4,1 t), Porto Belo (0,8 t) e Florianópolis (0,7 t) (SANTOS, 2012).

Porém essa produção muitas vezes excede o mercado consumidor local, principalmente nos meses em que a atividade turística fica prejudicada. Para que essa produção seja comercializada em outros locais no país, ou seja destinada à exportação, é necessário que esteja de acordo com a legislação dos países concorrentes. Os principais mercados de moluscos bivalves são a União Européia e os Estados Unidos, e nestes mercados, a aplicação da depuração de moluscos garante um produto final com alto valor comercial e com garantia de boas condições sanitárias (CORRÊA, 2007).

2.6 Microbiologia de moluscos bivalves e doenças associadas

A microbiota dos moluscos pode variar consideravelmente, dependendo das condições da água onde eles se encontram. Basicamente, os micro-organismos causadores de doenças pelo consumo de moluscos bivalves podem vir de três fontes de contaminação. Alguns estão naturalmente presentes no

ecossistema aquático (como *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* e *Listeria monocytogenes*), outros podem se fazer presentes nesse ambiente como resultado da contaminação por fezes animais (como *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Escherichia coli*) e alguns podem ser inseridos durante a manipulação e o processamento dos mesmos (como *Staphylococcus aureus*) (FELDHUSEN, 2000; LEE & YOUNGER, 2002). As patologias associadas ao consumo de frutos do mar resultantes da contaminação por micro-organismos podem ser provocadas por vírus, bactérias ou parasitas e resultam em uma gama variada de doenças que podem causar desde uma leve gastroenterite até doenças que oferecem risco de vida (IWAMOTO, 2010).

2.6.1 Vírus

2.6.1.1 Norovírus

Os norovírus são um dos quatro grupos de vírus que fazem parte da família *Caliciviridae*. Estes contém uma única molécula de RNA de fita simples e são transmitidos por via fecal-oral de pessoa para pessoa ou através de água ou alimentos contaminados por fezes humanas, uma vez que o único reservatório conhecido desses vírus é o homem (IWAMOTO et al, 2010).

Foram identificados pela primeira vez em 1972 dentre espécies coletadas de um surto de gastroenterite ocorrido em 1968, em Norwalk, Ohio e desde então vem sendo reconhecidos como o mais frequente agente causador de gastroenterites agudas não bacterianas nos Estados Unidos, contribuindo em 52% ou mais entre o total de casos registrados, ainda que esses números sejam subestimados devido à falta de disponibilidade ou de uso de testes diagnósticos de rotina, uma vez que esses vírus não podem ser cultivados em culturas de tecidos. Estão comumente associados ao consumo de alimentos consumidos crus, mariscos – principalmente ostras, água e framboesas. A dose infectante é

baixa, podendo ser inferior a 100 vírus, e os sintomas da doença duram em torno de 24-48h ainda que a eliminação assintomática dos vírus possa persistir por mais que um ano. Durante esse período de manifestações clínicas da doença (e mais provavelmente após o desaparecimento dos sintomas), os vírus replicam no intestino, o que propicia a propagação do vírus no ambiente (BUTT et al, 2004; LE GUYADER et al, 2006).

2.6.1.2 Vírus da Hepatite A (HAV)

Pertencente à família *Picornaviridae*, é um vírus de RNA de fita simples, envolto por um capsídeo proteico e classificado no grupo dos enterovírus (BUTT et al, 2004).

As manifestações comuns da doença geralmente são leves, no entanto podem ocorrer mortes por hepatites fulminantes, ainda que sejam muito raras. A severidade da doença está relacionada a outros fatores, como idade e condição imunológica. É considerada a infecção viral mais séria relacionada ao consumo de mariscos, ainda que sua ocorrência seja subestimada, pois relação entre a doença e a fonte de infecção muitas vezes não é definida, visto que a período de incubação do vírus é longo (2-8 semanas). A transmissão é fecal-oral e o homem é o único reservatório do vírus (IWAMOTO, 2010).

Surtos de hepatite A relacionados ao consumo de ostras vêm sendo descritos nos Estados Unidos desde a década de 1960. No entanto, o maior surto já reportado ocorreu em 1988, na China, afetando mais de 300 mil pessoas. O vírus possui certa resistência ao tratamento térmico e por isso tem a capacidade de persistir nos moluscos, devido à forma de preparo dos mesmo que normalmente não emprega calor suficiente pra inativar os vírus (BUTT, 2004; LOVE, LOVELACE & SOBSEY, 2010).

2.6.2 Bactérias

2.6.2.1 Vibrios

Vibrios são bactérias gram-negativas que fazem parte da família *Vibrionaceae*. São oxidase positivas, anaeróbias facultativas e, normalmente são identificadas como bastonetes curvos, embora às vezes não exibam a morfologia característica em forma de vírgula (JAY, 2005). A maioria das espécies é halofílica e necessita de adição de NaCl para que possam se desenvolver, com exceção do *Vibrio Cholerae* que é capaz de crescer em meios com baixa concentração de sal.

O gênero *vibrio* inclui 30 espécies, das quais ao menos 14 são reconhecidamente patogênicas para o homem. São amplamente difundidos no ambiente marinho e sua multiplicação nesse ambiente está relacionada à temperatura da água, salinidade e concentração de matéria orgânica. É encontrado em temperatura que variam de 10-30°C e salinidade entre 5% e 30%, no entanto estão mais presentes nos períodos em que as temperaturas são mais elevadas (IWAMOTO, 2010).

Várias espécies de vibrios já foram relacionadas a doenças transmitidas por alimentos (DTAs) pelo mundo e camarões, ostras, mexilhões, berbigões, caranguejos, lagostas e vieiras têm sido implicados na sua transmissão. As espécies mais relevantes em casos de surtos provocados por frutos do mar são o *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*. O primeiro causa uma infecção menos severa, provocando diarreia, cólicas abdominais, náuseas e vômitos, ainda que a septicemia possa ocorrer em alguns casos. Já o *Vibrio vulnificus* é uma espécie particularmente virulenta, especialmente entre os pacientes com doenças do fígado e doenças de depósito de ferro, mais propensos ao desenvolvimento da doença invasiva que pode levar a sepse e a graves infecções, as quais muitas vezes são fatais. Cerca de 20% das doenças bacterianas provocadas pelo consumo de mariscos estão relacionadas com espécies de víbrio, sendo o *Vibrio vulnificus* o maior responsável pelo número de mortes. As ostras são os vetores mais comumente relacionados (49% dos

casos relacionados a vibrios nos Estados Unidos) devido ao fato de serem organismos filtradores e terem a capacidade de concentrar esses organismos em uma quantidade até 100 vezes maior que a presente no ambiente (BUTT, 2004).

Doenças devidas ao *V. vulnificus* são a principal causa de mortalidade associada ao consumo de frutos do mar nos Estados Unidos. O *V. vulnificus* possui uma taxa de mortalidade de aproximadamente 50%, que é o mais elevado entre qualquer agente patogênico de origem alimentar, provocando uma infecção relativamente rara que resulta em aproximadamente 100 casos por ano, segundo estimativas do CDC. Quase todos esses casos foram esporádicos e ligados ao consumo de ostras cruas com origem na costa do golfo durante o período de abril a novembro (DEPAOLA, 2010).

Como medidas para controle de vibrios em ostras pode-se usar a cocção que, na temperatura adequada inativa-os completamente. A transferência das ostras para áreas com baixa contaminação e a depuração também já se mostraram eficazes na remoção dessas bactérias.

2.6.2.2 *Salmonella*

A *Salmonella* é um bacilo gram-negativo, anaeróbio facultativo não formador de esporos e fermentador de glicose com produção de gás (JAY, 2005). Aproximadamente 2.500 diferentes sorotipos já foram identificados, causando uma variada gama de sintomas que vão desde a existência assintomática até a doença invasiva. Nos Estados Unidos, são registrados anualmente 1,4 milhões de casos de salmonelose, resultando em aproximadamente 500 mortes.

Cerca de 7% dos surtos de salmonelose estão relacionados ao consumo de frutos do mar, particularmente peixes, camarões, ostras e amêijoas. *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* é o sorotipo mais comum causador de infecções e mortes, seguida pela *S. enterica* serovar *Typhimurium*. Os seres humanos são o único reservatório conhecido da *Salmonella* sorotipo *Typhi*, mas muitos hospedeiros animais (aves, répteis e

mamíferos) servem como reservatórios para os sorotipos não *Typhi*. Dessa forma, a *Salmonella* entra em contato com as ostras através de águas contaminadas por esgotos. Martinez-Urtaza et.al. (2003) pesquisaram a presença de *Salmonella spp.* Em moluscos na região da Galícia, Espanha, e encontraram uma incidência dessa bactéria em 1,8% das amostras testadas, apresentando um ligeiro aumento durante os três anos de estudo.

Em 2005, Brands et al avaliaram a frequência de contaminação das ostras nos Estados Unidos, analisando um total de 36 baías das costas leste, oeste e do golfo (12 baías de cada região) e encontraram 93 ostras positivas para *Salmonella* entre um total de 1.296 amostras analisadas, sendo que algumas delas não apresentaram contaminação por coliformes termotolerantes.

2.6.2.3 *Aeromonas*

Também pertencentes à família *Vibrionaceae*, são bacilos gram-negativos fermentares da glicose e têm sido isoladas a partir de frutos do mar em diversas regiões. As espécies mais encontradas são *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas sobria*. Em um estudo que avaliou a contaminação de bagres, foi encontrado *A. hydrophila* em mais de 36% das amostras e *A. sobria* em 35,7%. É transmitida por água e alimentos contaminados e são capazes de resistir a temperaturas de congelamento, no entanto a contaminação é maior nos meses de temperaturas mais elevadas (BUTT, 2004; IWAMOTO, 2010).

2.6.2.4 *Listeria monocytogenes*

É um bacilo gram-positivo, anaeróbio facultativo, com temperatura ótima de crescimento entre 30°C e 37°C, porém também são capazes de crescer em temperaturas mais baixas. Seu reservatório primário é o solo e as plantas em decomposição, embora 10-15% da população seja portadora dessa bactéria (JAY, 2005).

A incidência de listeriose nos Estados Unidos é de 4 a 7 casos por milhão de pessoas, totalizando cerca de 2500 casos por ano, com aproximadamente 500 mortes. Normalmente estão associadas a leite e derivados, porém já foram isoladas em amostras de frutos do mar. O primeiro surto de listeriose reportado em produtos marinhos ocorreu em 1980 na Nova Zelândia (IWAMOTO, 2010).

A maioria dos casos de infecção por listéria ocorre em mulheres grávidas, bebês, e idosos, normalmente causando um simples resfriado, mas podendo evoluir para doença mais severa, uma vez que essa bactéria possui tropismo pelo sistema nervoso central. Nos casos envolvendo frutos do mar, a principal fonte de contaminação provavelmente está associada às linhas de produção e ao ambiente de processamento dos mesmos (BUTT, 2004).

2.6.2.5 *Clostridium botulinum*

É um bacilo gram-positivo formador de esporos, anaeróbio e amplamente difundido no ambiente. São classificados em quatro grupos distintos de acordo com sua atividade proteolítica e tipo de toxina produzida. As toxinas produzidas são termo lábeis e classificadas como A, B, C, D, E, F e G, sendo que a toxina tipo E é a predominante nos casos de intoxicação alimentar (APHA, 2001).

Casos de botulismo são raros mais muito graves. A doença é caracterizada por paralisia aguda dos músculos e pode levar à morte por afetar os músculos respiratórios. A produção de toxina se dá em condições anaeróbias e com pH pouco ácido (maior que 4,6), portanto estão mais comumente associadas à conservas caseiras, embora outros alimentos, como frutos do mar salgados e defumados, batatas assadas em papel alumínio e alho preparado em óleo já tenham sido implicados em casos de botulismo. Com relação aos frutos do mar, normalmente a doença está associada a alimentos fermentados sob condições anaeróbicas (BUTT, 2004).

Por ser uma bactéria muito difundida no ambiente, a contaminação de áreas de cultivo é comum. Em alguns lugares, quase 100% dos sedimentos presentes na água em áreas de colheita de peixes estão contaminadas com *Clostridium botulinum* tipo E.

2.6.2.6 *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, e *Bacillus cereus*

Outras bactérias podem também produzir toxinas causadoras de enfermidades gastrointestinais agudas. É o caso do *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, e *Bacillus cereus*. Os sintomas tipicamente observados em intoxicações por com *S. aureus* e *B. cereus* são náuseas, vômitos e diarreia leve que ocorrem de 1 a 6 horas após a ingestão de alimentos contaminados. Esse curto período de incubação se deve ao fato de a toxina estar pré-formada no alimento ingerido. A intoxicação com *C. perfringens* tem um período de incubação ligeiramente mais longo, pois a toxina é produzida no trato gastrointestinal. Os sintomas incluem diarreia e cólicas abdominais a partir de 8 a 16 h após a ingestão dos alimentos contaminados (IWAMOTO, 2010).

Para *S. aureus*, o homem é o principal reservatório e a contaminação se dá principalmente através dos manipuladores durante a preparação. *Clostridium perfringens*, e *Bacillus cereus* são bactérias difundidas no ambiente e a contaminação de frutos do mar se dá de maneira semelhante a que ocorre em outros alimentos. Os surtos estão geralmente associados a alimentos deixados em temperaturas inadequadas durante períodos prolongados de tempo, o que permite a multiplicação dos microorganismos e a produção de enterotoxina, o que ressalta a importância das boas práticas no preparo e armazenamento dos alimentos (BUTT, 2004).

2.6.3 Protozoários

Normalmente os protozoários não estão relacionados com enfermidades causadas por alimentos, no entanto, alguns casos já foram reportados e, na maioria deles, o parasita responsável foi *Giardia spp.* As manifestações clínicas podem incluir dor abdominal, flatulência, anorexia e diarreia. O homem e outros animais são reservatórios para esse protozoário, e a contaminação dos alimentos se dá pela manipulação inadequada durante o preparo (IWAMOTO, 2010).

Oocistos de *Cryptosporidium parvum* também foram detectados em mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*) e berbigões (*Cerastoderma edule*) em uma região considerada a mais importante da Europa para a produção de mariscos – a Galícia, no norte da Espanha. Esses oocistos foram recuperados apenas de áreas localizadas próximas ao deságue de rios, sendo que cada marisco continha uma carga parasitária maior que 10^3 oocistos, os quais se mostraram ainda com capacidade infectiva, demonstrando que os mexilhões e berbigões poderiam atuar como reservatório de *C. parvum* capaz de causar infecção em humanos. (GOMEZ-BAUTISTA, 2000)

2.7 Dados Epidemiológicos

Por serem organismos filtradores, as ostras tendem a acumular os micro-organismos em suspensão na água, concentrando-os em seus tecidos. Foi demonstrado que, no caso dos coliformes fecais, essa concentração pode chegar a quatro vezes a concentração da água na qual elas se encontram. Portanto, a qualidade microbiológica desses organismos como alimento, está diretamente relacionada à qualidade da água em que são cultivados. Caso as condições da água não sejam adequadas esses organismos podem funcionar como vetores de transmissão para várias doenças, o que é preocupante, tendo em vista que elas são muitas vezes consumidas cruas ou parcialmente cozidas (BUTT, 2004; APHA, 2001, JAY, 2005). A tabela 2 relaciona os perigos associados ao consumo de moluscos bivalves.

Tabela 2: Perigos associados ao consumo de moluscos bivalves. (FAO, 2008).

Perigos associados ao consumo de moluscos bivalves	
Classe do perigo	Contaminantes
Infecções	Bactérias <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Campylobacter</i> spp, <i>Listeria monocytogenes</i>
Intoxicações	Vírus Norovírus, Vírus da Hepatite A Agentes químicos Metais pesados: Mercúrio (Hg), Cádmio (Cd), Chumbo (Pb) Orgânicos; Dioxinas, PCBs, PAHs, pesticidas Biotoxinas Toxina paralisante (PSP), Toxina diarreica (DSP), Toxina Amnésica (ASP), Neurotoxina (NSP)

No que se refere aos contaminantes químicos, que podem estar presente em certas áreas de cultivo, não se tem dados suficientes na literatura que permitam afirmar que o desenvolvimento de doenças associadas ao consumo de moluscos contaminados com substâncias químicas seja um problema significativo.

Entre os contaminantes biológicos, alguns micro-organismos e suas toxinas são de ocorrência natural no ambiente marinho, como certas espécies de *vibrio*. Entretanto, alguns micro-organismos provenientes de outras fontes podem ser carregados para as áreas de cultivo, como é o caso das bactérias e vírus causadores de gastroenterites, como *Salmonella* e norovirus, presentes nas fezes humanas e que podem, acidentalmente, contaminar áreas de cultivo. Isso ocorre principalmente após a queda de chuvas fortes que acabam carregando para o mar esgoto sem tratamento (LEE, LOVATELLI & ABABOUC, 2008; MAALOUF, 2010). A tabela 3 lista os principais micro-organismos causadores de doenças relacionadas ao consumo de bivalves, informando os sintomas mais comuns e o período de incubação para cada um deles.

Tabela 3: Micro-organismos causadores de doenças relacionadas ao consumo de bivalves (FAO, 2008).

Micro-organismo	Período de incubação	Duração	Principais sintomas	Principais fontes de contaminação de mariscos
Bactérias				
<i>S. typhi</i> e <i>S. paratyphi</i>	<i>Tipty:</i> 1-3 semanas <i>Paratipy:</i> 1-10 dias	<i>Tipty:</i> até 4 semanas <i>Paratipy:</i> 2-3 semanas	Mal-estar, dor de cabeça, febre, tosse, vômitos, constipação, dor abdominal, calafrios, manchas rosadas, sangue nas fezes	Fezes humanas Esgoto
Outras espécies de <i>Salmonella</i>	6 a 72 horas, maioria entre 18-36 horas	4-7 dias	Dor abdominal, diarreia, calafrios, febre, náusea, vômito e mal-estar	Fezes humanas e de animais Esgoto
<i>Campylobacter</i>	2 a 7 dias	3-6 dias	Diarréia (frequentemente com sangue), fortes dores abdominais, febre, anorexia, mal-estar, dor de cabeça, vômito	Fezes de animais
<i>Shigella</i>	24 a 72 horas	5-7 dias	Dor abdominal, diarreia, fezes com sangue e muco, febre	Fezes humanas Esgoto
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2 a 48 horas, maioria 12 horas	2-14 dias (em média 2,5 dias)	Dor abdominal, diarreia, náuseas, vômito, febre, calafrios, dores de cabeça	Ambiente marinho
<i>Vibrio vulnificus</i>	Maioria 16 horas < 24 horas	2-3 dias	Mal-estar, calafrios, febre, lesões cutâneas Podem ocorrer mortes	Ambiente marinho
<i>Vibrio cholerae</i>	1-5 dias,	2-5 dias	Diarreia aquosa profusa, vômito,	Fezes humanas

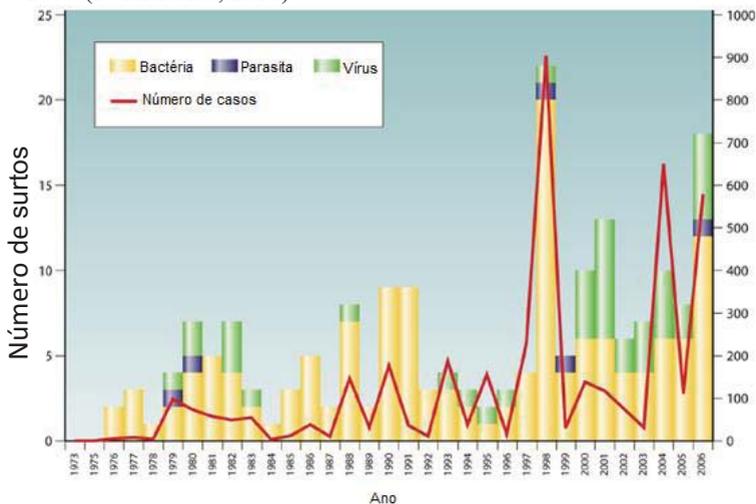
sorotipo O1 e O139	normalmente 2-3 dias		dor abdominal, desidratação	Esgoto
Outros sorotipos de <i>Vibrio cholerae</i>	2-3 dias	Até 1 semana	Diarreia aquosa	Ambiente marinho
Vírus				
Vírus da Hepatite A	10 a 50 dias	10 a 30 dias	Febre, mal-estar, anorexia, náusea, dor abdominal, cansaço, icterícia	Fezes humanas
	Majoria 25 dias	10% dos infectados apresentam sintomas prolongados ou reincidentes durante 6-9 meses		Esgoto
Norovirus	1-3 dias	20 a 72 horas	Diarreia, náusea, vômito, dor abdominal, cólicas abdominais	Fezes humanas
	maioria 36 horas			Esgoto
Astrovirus	1 a 2 dias	48 a 72 horas	Diarreia, algumas vezes acompanhada de outros sintomas entéricos	Fezes humanas
				Esgoto

As doenças transmitidas por alimentos causam aproximadamente 76 milhões de casos, 325.000 hospitalizações e 5.000 mortes nos Estados Unidos a cada ano e as estimativas atribuem 10-19% destas doenças ao consumo de frutos do mar (MORRISON, 2011).

No entanto, quando se fala de doenças transmitidas por alimentos, deve-se ter em mente que muitos casos não são notificados e que na maioria dos surtos alimentares (67,8%) o agente da doença não pode ser identificado. Segundo dados de países membros da Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD), as doenças de origem alimentar estão mais comumente associada a ovos e produtos lácteos (14,62%), carne vermelha (8,53%), aves (4,14%) e frutos do mar (6,63%). Considerando que o consumo desses outros alimentos é muito superior ao consumo de frutos do mar, esses números permitem classificar os alimentos de origem marinha como um veículo importante na causa de DTA.s. (OLIVEIRA, 2011)

Segundo o Sistema de Vigilância de Surtos Relacionados a Alimentos (*Food-Borne Disease Outbreak Surveillance System*), durante o período de 1973 a 2006, nos Estados Unidos, ocorreram 188 surtos causados por frutos do mar, resultando em 4.020 casos, com 161 hospitalizações e 11 mortes. Esses surtos foram causados tanto por bactérias, como vírus e protozoários, mas a grande maioria é devida a contaminação bacteriana (Figura 7). Os moluscos foram as principais fontes de infecção, computando 45,2% dos casos, seguidos pelos peixes (38,8%) e os crustáceos (16%). (IWAMOTO, 2010).

Figura 7: Número de surtos associados a frutos do mar confirmados e casos relacionados, por ano e agente etiológico nos EUA entre 1973 e 2006 (IWAMOTO, 2010).



Historicamente, a *Salmonella typhi* foi a bactéria mais importante envolvida em epidemias nos Estados Unidos, porém esse quadro foi se alterando e outros contaminantes foram se tornando mais significantes, como por exemplo vírus entéricos e membros da família *Vibrionaceae* (APHA, 2001; RIPABELLI, 1999). Ainda nos Estados Unidos, de acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*, entre os anos de 2000 e 2009, foram confirmados 19 surtos de doenças de origem bacteriana transmitidas por alimentos envolvendo a ingestão de ostras. Destes, 79,0% foram causados por *Vibrio parahaemolyticus*, 10,6%, por *Vibrio cholerae*, 5,2% por *Salmonella typhi*, e 5,2% por *Campylobacter jejuni*, envolvendo um total de, aproximadamente, 472 pessoas (DARAMOLA, 2009).

Na Grã-Bretanha, um estudo durante um período de quatro anos mostrou que o risco de doenças associadas ao

consumo de mariscos é mais que seis vezes maior comparado a aves e cerca de 27 vezes maior que da carne vermelha (MORRISON, 2011.)

Sabidamente, patógenos entéricos possuem um importante papel no aparecimento de surtos associados a frutos do mar ao longo da história. Um dos maiores surtos já documentados ocorreu na China, provocando 300.000 casos de hepatite A, no qual o veículo de transmissão foram ostras contaminadas com vírus proveniente de esgotos (LOVE, LOVELACE & SOBSEY, 2010).

2.8 *Escherichia coli* como indicador

A *E. coli* é um bacilo gram-negativo não esporulado, pertencente à família das *Enterobacteriaceae*, cujo ambiente natural é o trato intestinal do homem e de outros animais de sangue quente. Essas bactérias são aeróbias e anaeróbias facultativas e também são incluídas dentro do grande grupo dos coliformes termotolerantes, anteriormente chamados de coliformes fecais, por serem capazes de fermentar a lactose com produção de gás em 48h a temperatura de 44,5°C a 45,5°C. (APHA, 2001; JAY, 2005) Sabe-se que a *E. coli* e a espécie humana coexistem há décadas e que a colonização do trato gastrointestinal por esses micro-organismos ocorre algumas horas após o nascimento, sendo que raramente causam doenças em indivíduos saudáveis, exceto algumas cepas que desenvolveram fatores de virulência e podem levar a complicações mais graves (KAPER, NATARO, & MOBLEY, 2004).

A *E.coli* foi descoberta em 1885 por Escherich, na tentativa de isolar a bactéria causadora da cólera e inicialmente foi denominada *Bacterium coli commune*, devido a sua presença nas fezes de todos os pacientes examinados. Posteriormente, foi sugerido que esse micro-organismo fosse utilizado como indicador de contaminação fecal, já que pode ser isolado e identificado mais facilmente que outros patógenos presentes na água. O teste para mensurar a potabilidade da água, em 1895, marcou o início do uso dos coliformes como indicadores de

patógenos em águas, o que posteriormente se estendeu ao leite pasteurizado e produtos lácteos e então a outros alimentos (APHA, 2001; JAY, 2005). No entanto, a determinação de coliformes não é tão útil para se definir se ocorreu uma contaminação fecal e dessa forma, a contagem de *E. coli* foi sendo mais utilizada, uma vez que o seu habitat primário e o trato intestinal de animais de sangue quente, diferentemente de outros coliformes que podem também estar presentes no ambiente.

Porém, o uso desse grupo de bactérias como indicador sanitário vem sendo questionado, uma vez que nem sempre níveis altos desses micro-organismos estão correlacionados com o aumento da probabilidade de se encontrar micro-organismos patogênicos, bem como sua ausência não significa sempre que o alimento está livre de patógenos entéricos. Um exemplo disso ocorreu em 1994, quando um surto de *Salmonella enteritidis* causado pelo consumo de sorvete, mostrou que células suficientes para provocar infecção foram encontradas em um produto com baixas contagens de coliformes e *E.coli* (<1 UFC/g) (APHA, 2001).

2.9 Legislação

Devido às várias enfermidades relacionadas ao consumo de bivalves, algumas medidas foram tomadas para garantir sua segurança microbiológica.

Um dos primeiros passos para uma regulamentação mais efetiva se deu com a ocorrência de um surto de febre tifoide em 1924, nos Estados Unidos, ligado a ostras contaminadas por resíduos de esgoto. No ano seguinte, o Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos criou o *USA National Shellfish Sanitation Program* (NSSP) a fim de controlar as doenças transmitidas por moluscos, restringindo a venda em certas áreas de cultivo.

A Diretiva Europeia 2006/113/CE, a Diretiva Europeia 2004/41/CE, o acordo interestadual americano estabelecido pela *Food and Drug Administration* (FDA) e o Comitê Consultivo do Reino Unido de Segurança Microbiológica de Alimentos são

diretrizes para o monitoramento de áreas de produção de moluscos (OLIVEIRA, 2011)

Atualmente, nos Estados Unidos, as áreas de produção são avaliadas quanto à presença de coliformes termotolerantes e classificadas em permitidas, sob restrição ou proibidas. Na Europa, a carne dos moluscos é avaliada quanto à presença de *E. coli* e as áreas são classificadas como qualidade A, B, C ou proibidas. No caso das áreas liberadas e de qualidade A, o produção pode ser vendida diretamente ao consumidor. As zonas classificadas como B e C ou sob restrição, os moluscos podem ser comercializados desde que passem primeiramente por um processo de descontaminação (LOVE, LOVELACE & SOBSEY, 2010).

No Brasil, de acordo com a atual legislação, a resolução n. 12, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a avaliação de moluscos *in natura* exige somente a análise para *Staphylococcus* coagulase positiva, com limite de até $1,0 \times 10^3$ UFC g-1 e ausência de *Salmonella* sp. em 25g. O limite para coliformes a 45 °C somente é estabelecido para moluscos bivalves, temperados ou não, industrializados, resfriados ou congelados, sendo este de $5,0 \times 10$ NMP g-1 (ANVISA, 2001).

Para o monitoramento das águas de cultivo, resolução n. 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente estabelece o monitoramento através da avaliação dos níveis de coliformes termotolerantes, sendo que a média geométrica da densidade de coliformes a 45 °C, de um mínimo de 15 amostras coletadas no mesmo local, não deverá exceder 43 por 100 mL, e o percentil 90% não deverá ultrapassar 88 coliformes a 45 °C por 100 mL. Esses índices deverão ser mantidos em monitoramento anual com um mínimo de cinco amostras. A enumeração de *Escherichia coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro de coliformes a 45 °C de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente (CONAMA, 2005).

Em 2005, através do decreto nº 5.564, de 19 de outubro (BRASIL, 2005), foi instituído o Comitê Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves, formado pelo Ministério de Aquicultura e Pesca, Ministério da Agricultura

Pecuária e Abastecimento e Agência Nacional, com a finalidade de estabelecer e avaliar os requisitos necessários para garantia da qualidade higiênico-sanitária dos moluscos bivalves.

Posteriormente, através da Instrução Normativa Interministerial No 7, de 8 de maio de 2012, o Ministério da Pesca e Agricultura instituiu o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB) a fim de monitorar a quantidade de micro-organismos e biotoxinas marinhas em moluscos bivalves. De acordo com o disposto na lei, a retirada de moluscos bivalves destinados ao consumo humano é definida como: liberada, liberada sob condição ou suspensa. Essa classificação depende dos seguintes parâmetros:

Tabela 4: Critérios para retirada de moluscos bivalves.

NMP para <i>E.coli</i> em 100g da parte comestível dos moluscos bivalves	Limites de biotoxinas produzidas por microalgas em 1kg da parte comestível dos moluscos bivalves					
	PSP	DSP	DSP	ASP	AZP	
Retirada liberada						
<230	<0,8mg (eq-STX)	<0,16mg (eq-OA)	<1mg (eq-YTX)	<20mg (DA)	<0,16mg (eq-AZA1)	
Retirada liberada sob condição						
≥230 e ≤46.000	<0,8mg (eq-STX)	<0,16mg (eq-OA)	<1mg (eq-YTX)	<20mg (DA)	<0,16mg (eq-AZA1)	
Retirada suspensa						
>46.000	≥0,8mg (eq-STX)	≥0,16mg (eq-OA)	≥1mg (eq-YTX)	≥20mg (DA)	≥0,16mg (eq-AZA1)	

No caso dos moluscos provenientes de áreas liberadas, os mesmos podem ser destinados vivos ao consumo humano sem a necessidade de tratamento complementar. No caso dos moluscos advindos de áreas com liberação sob condição, os mesmos podem ser comercializados somente após depuração, processamento térmico ou remoção das vísceras e gônadas de acordo com a espécie processada e o tipo de produto obtido.

Se o método de descontaminação escolhido for a depuração, os estabelecimentos que a realizarem devem apresentar uma descrição detalhada do processo, especificando, entre outras coisas, o tempo e a capacidade de depuração. O método escolhido deve ter sua eficiência comprovada através de análises microbiológicas adequadas a cada espécie. Os tanques de depuração devem, ainda, ser constituídos de material não poroso e resistente onde a matéria-prima se mantenha afastada do fundo, evitando a suspensão dos resíduos oriundos da depuração. O recipiente onde os moluscos serão colocados devem ser construídos de maneira a permitir a circulação uniforme da água pelo tanque.

2.10 Sistemas de depuração

A depuração consiste na transferência dos moluscos contaminados para tanques de água limpa para que, através do processo natural de filtração os patógenos sejam eliminados, porém cabe salientar que diferentes micro-organismos possuem diferentes velocidades de depuração e particularidades distintas de temperatura e pH ótimos para a eliminação de patógenos. A tabela 5 mostra alguns dados encontrados por diferentes autores em experimentos de depuração.

Tabela 5: Tempos de deuração necessários para eliminação de 90% da carga de contaminação para diferentes micro-organismos. Adaptado de Lee & Younger, 2002.

Contaminante	Marisco	T90 (horas)	% Presente após 42-48h	Referência
<i>E. coli</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	6 - 6,5	ND ^a	Doré e Less (1995)
	<i>Mytilus edulis</i>	3 - 4,5	ND	Doré e Less (1995)
<i>Salmonella</i>	<i>Mercenaria</i>	ND	0,1 (24h)	Timoney e Abston (1984)
<i>Campylobacter</i>	<i>Saccostrea commercialis</i>	<48	<1	Arumugaswamy et al. (1988)
	Oysters	ND	44	Jones et al. (1995)
F+ colifagos	<i>Crassostrea gigas</i>	55 - 61	ND ^a	Doré e Less (1995)
	<i>Mytilus edulis</i>	41-17	ND	Doré e Less (1995)
Colifagos somáticos	<i>Crassostrea gigas</i>	643 – 2431	ND	Mesquita et al. (1991)
Enterovirus NLV's	<i>Mytilus edulis</i>	Aprox. 16	4,5 (52h)	Power e Collins (1989)
Vírus da hepatite A e Rotavírus	<i>Mytilus edulis</i>	ND	02 – 6,2	Bosch et al. (1994)

^aND – Não determinado

Os sistemas de depuração também possuem variações, podendo ser do tipo aberto, com fluxo de água contínuo, do tipo *Batch-process*, onde a água é substituída em intervalos regulares ou ainda, do tipo fechado, com recirculação da água (CORRÊA, 2006). Todos os tipos são eficientes, no entanto os dois primeiros requerem uma grande quantidade de água do mar de boa qualidade e fica inviável se o sistema de depuração está localizado distante dessa fonte. Por isso, o sistema de recirculação vem sendo empregado. A depuração deve ocorrer de maneira que os moluscos bivalves eliminem a contaminação, não voltem a ser contaminados e permaneçam vivos ao final do processo. A fonte de água do mar deve ser limpa e continuamente tratada através de um sistema de desinfecção aprovado que não deixe resíduos indesejáveis no produto (BRASIL, 2012).

A escolha do sistema mais adequado depende de vários aspectos, como o custo de implantação, custo operacional, facilidade e custo de manutenção, eficiência, efeitos residuais e tempo de contato necessário (SUPLICY, 1998).

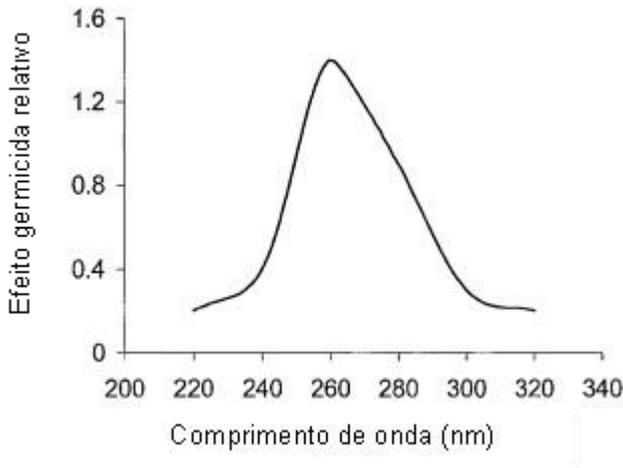
O primeiro método de desinfecção química da água, utilizada para a purificação de moluscos foi a cloração, por causa da capacidade desinfetante e da fácil manipulação. No entanto, o uso de formas livres de cloro tem sérias restrições, pois, como muitos outros fatores, também afeta a capacidade de filtração dos moluscos além de afetar a qualidade do produto final, podendo alterar a aparência e o gosto dos mesmos. Dessa forma, métodos alternativos de purificação da água devem ser explorados, a fim de minimizar as alterações organolépticas dos moluscos ao final do processo.

2.11. UV Germicida

A luz ultravioleta, descoberta em 1801 pelo físico alemão Johann Wilhelm Ritteré, é considerada uma radiação não-ionizante (não capaz de ionizar os átomos presentes na matéria) localizada no espectro de luz entre os raios-X e a luz visível. Para fins práticos, ela é classificada, de acordo com o seu comprimento de onda, em três principais tipos: UVA (320 a 400 nm), UVB (280 a 320 nm) e UVC (200 a 280 nm). A principal fonte de radiação ultravioleta é o Sol, que emite radiação nos vários comprimentos de onda. No entanto, os raios UVC são completamente absorvidos pela atmosfera, os raios UVB são

parcialmente absorvidos e atenuados antes de chegar à superfície e maioria da radiação que chega a Terra é do tipo UVA (BINTSIS, LITOPOULOU-TZANETAKI & ROBINSON, 2000). Na área da biologia, os raios UVC são largamente utilizados para desinfecção do ar, de superfícies e de líquidos, sendo considerados germicidas, com seu pico máximo de eficácia em 254 nm.

Figura 8: Letalidade dos diferentes comprimentos de onda da luz UV.



Esses raios atuam a nível molecular, interagindo com o DNA das células e provocando alterações no mesmo. O principal efeito da exposição de DNA ao UVC é a formação de dímeros de pirimidina. A radiação altera a estrutura do DNA, provocando o bloqueio da transcrição do RNA mensageiro e falha no processo de replicação semiconservativa. Se o mecanismo reparador não for eficiente, essas falhas no DNA podem impedir a célula de se reproduzir e até mesmo provocar a morte celular (BEGUM, HOCKING & MISKELLY, 2009).

A irradiação ultravioleta foi utilizada para desinfecção da água pela primeira vez em 1910, em Marseille, fato possibilitado graças ao desenvolvimento das lâmpadas de mercúrio e tubos de quartzo. Porém, devido ao alto custo do processo e com o aparecimento do cloro, sua utilização ficou prejudicada (HIJNEN, 2006).

Com o tempo, estudos mostraram que o tratamento com agentes químicos como cloro pode gerar subprodutos tóxicos, e o tratamento com UV ganhou mais atenção (HIJNEN, BEERENDONK &

MEDEMA, 2006; HASSEN, 2000). Além disso, a irradiação ultravioleta possui um curto período de contato e maior eficácia na inativação de vírus.

Linden et al (2002) demonstraram que doses de UV foram eficazes também na inativação da infectividade de cistos de *Giardia lamblia*, um importante protozoário relacionado com surtos causados por contaminação da água potável.

Apesar da comprovada eficiência da desinfecção por UV contra uma variada gama de micro-organismos, incluindo fungos, bactérias, vírus, protozoários e algas, e de ser uma tecnologia que não provoca alterações de cor, odor, e pH no material irradiado, sua utilização também tem suas limitações. A matéria orgânica e outras partículas em suspensão na água podem diminuir a efetividade do tratamento, portanto, no caso da utilização desse sistema para depuração de moluscos bivalves, é necessário que a água passe por um processo de filtração para retirada de partículas antes de ser colocada na depuradora.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Obtenção das ostras

As ostras, *Crassostrea gigas*, foram adquiridas de um cultivo na localidade de Santo Antônio de Lisboa, Florianópolis, Santa Catarina. As unidades foram acondicionadas em uma caixa de isopor e levadas diretamente ao laboratório de Microbiologia de Alimentos, localizado no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, onde foram colocadas em um tanque de contaminação contendo água salina em temperatura ambiente.

Figura 9: *Crassostrea gigas*



3.2 Obtenção da água salina

A água foi obtida do laboratório de Moluscos Marinhos, localizado na unidade da Barra da Lagoa do Centro de Ciências Agrárias da UFSC. A cada experimento, 600L de água salina filtrada foram transportados até o laboratório de microbiologia, acondicionados em três galões de plástico, previamente limpos, de 200L cada. Essa água foi filtrada em filtros de polipropileno de 50 μ m, 5 μ m e 1 μ m e foi utilizada tanto para os tanques de contaminação (aproximadamente 150L em cada um dos dois tanques) quanto para a depuradora (cerca de 300L).

3.3 Parâmetros da água salina

O pH da água foi verificado antes de cada experimento por meio de um medidor de pH e a temperatura da mesma foi monitorada durante o processo de depuração. A cada retirada de amostras (0h, 12h, 18, 24h, 36h e 48h) a temperatura foi registrada e posteriormente calculou-se a temperatura média para cada depuração.

Também, com o auxílio de um oxímetro, foi monitorada a quantidade de O₂ na água da depuradora.

3.4 Obtenção do inóculo

A cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 foi cultivada inicialmente em ágar Eosina Azul de Metileno (EAM) a 37±1°C. Após 24h, uma colônia isolada foi transferida para 10mL de caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) que foi incubado por 18-20h a 37±1°C. Para determinar a concentração de *E.coli* em cada mL desse caldo, diluições decimais da cultura em *overnight* foram inoculadas em Ágar Padrão para Contagem. A partir do resultado obtido, calculou-se a quantidade necessária de caldo BHI que deveria ser utilizada para 150L de água (0,25mL) para atingir a concentração desejada de *E. coli* nas ostras (entre 230 e 46000 NMP por 100g de carne).

3.5 Contaminação das ostras

As amostras trazidas ao laboratório de microbiologia foram lavadas com água potável e colocadas no tanque de contaminação contendo aproximadamente 150L de água salina com aeração permanente e foram, então, contaminadas com o caldo obtido no item 4.4. A cada experimento foram utilizadas 60 dúzias de ostras que permaneceram por aproximadamente 20h em contato com o micro-organismo *E.coli*.

3.6 Depuração

Após a contaminação, as ostras foram lavadas com água potável corrente e transferidas para a depuradora, também localizada no CAL/CCA. Assim que retiradas do tanque de contaminação, uma amostra de 12 unidades foi analisada em laboratório para determinar a

carga inicial de *E. coli* de acordo com o método ISO/TS 6649-3:2005 (tempo zero). Durante o processo de descontaminação, mais cinco coletas foram feitas, nos tempos de 12h, 18h, 24h, 36h e 48h. Durante o processo de depuração foi monitorada a temperatura e oxigenação da água.

Em todas as coletas foram retiradas 12 unidades que foram imediatamente analisadas quanto à presença de *Escherichia coli*. Em cada repetição foram depuradas 60 dúzias de ostra, considerando-se esta quantidade a capacidade máxima da depuradora. As ostras foram distribuídas uniformemente entre os seis cestos plásticos, 10 dúzias para cada cesto, permitindo a circulação da água. Para a análise, procedeu-se a retirada aleatória de duas ostras de cada cesto, garantindo a homogeneidade da amostra.

3.7 Parâmetros da depuradora

A depuradora, obtida da empresa Marine Equipment Ltda., é construída com polietileno de média densidade, possui parede dupla e revestimento interno de espuma de polietileno, o que proporciona isolamento térmico. O sistema é fechado e uma bomba magnética permite a circulação da água de maneira uniforme. A aeração é mantida pelo processo de bombeamento da água através de um cano perfurado.

A esterilização da água é realizada por uma lâmpada UV de 55 W com aeração constante.

A depuradora possui dimensões de 1,20m x 1,20m, com capacidade para 600L e é capaz de depurar 60 dúzias de ostras ou 90kg de mexilhão por ciclo.

A figura 10 mostra as ostras *Crassostrea gigas* em processo de depuração.

Figura 10: Ostras *Crassostrea gigas* em processo de depuração.



3.8 Ensaios Microbiológicos

As análises foram realizadas de acordo com o método ISO/TS 6649-3:2005 para determinação de *Escherichia coli* por NMP.

3.9 Método de Ensaio

Após serem retiradas da depuradora, as amostras foram imediatamente levadas ao laboratório de microbiologia e lavadas em água potável corrente. Todo material aderido às conchas foi raspado e retirado com o auxílio de uma escova. As ostras já limpas foram transferidas para bandejas plásticas previamente desinfetadas com álcool 70% e então abertas com uma faca estéril. A carne e o líquido intervalar das 12 ostras representantes de uma amostra foram transferidos assepticamente para um saco estéril, constituindo o “pool” de cada amostra.

Para o ensaio microbiológico, 25g do “pool” obtido anteriormente foram diluídos em 225 mL de água peptonada tamponada salina 0,85% e homogeneizados manualmente durante 30 segundos. Essa foi considerada a diluição 10^{-1} . Aliquotas de 10mL, 1mL, 0,1 mL foram inoculadas em 3 séries de 5 tubos contendo caldo CGM (Caldo Glutamato Modificado) em dupla, simples e simples concentração, respectivamente.

Quando necessário, foram feitas diluições decimais, transferindo 1mL da diluição 10^{-1} para um tubo contendo 9mL de água peptonada salina 0,85% e a partir dessa obtendo as diluições necessárias, que também foram inoculadas em caldo CGM de concentração simples.

Após um período de 24h a 37°C, os tubos positivos que apresentaram viragem da coloração do meio de roxo para amarelo (Figura 11) foram repicados para o meio cromogênio *Tryptone Bile X-Glucuronide* (TBX). As placas foram incubadas invertidas a 44°C por mais 24h e as diluições que apresentaram crescimento de colônias azuis (Figura 12) foram consideradas como positivas para presença de *E.coli*.

Figura 11: Caldo CGM antes (A) e depois (B) da inoculação.

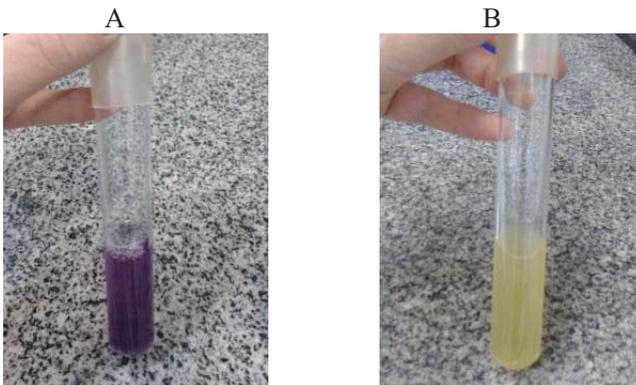
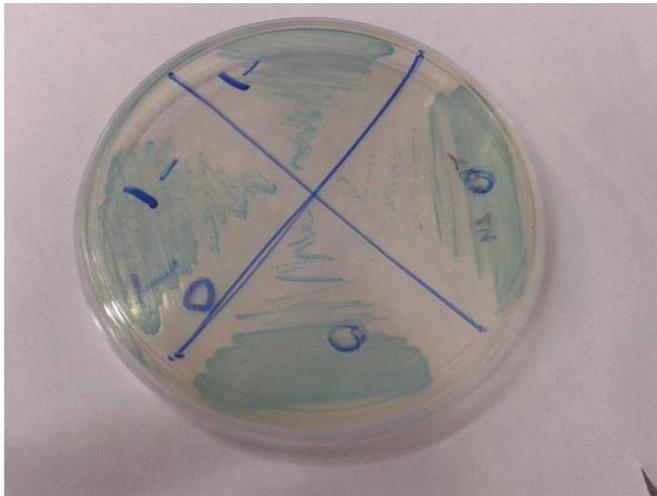


Figura 12: Meio TBX positivo para identificação de *E. coli* (colônias azuis).



3.10 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram transformados em log e analisados no programa *Estatística* versão 7 utilizando-se a ANOVA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros da água salina

4.1.1 pH

Os valores de pH da água salina utilizada em cada ciclo de depuração apresentaram pouca variação nas diferentes repetições.

Repetição 1: pH 8,2

Repetição 2: pH 8,0

Repetição 3: pH 7,8

Repetição 4: pH 7,7

Repetição 5: pH 8,0

Repetição 6: pH 8,1

4.1.2 Temperatura

A tabela 6 contém os valores de temperatura obtidos a cada ciclo de depuração, com suas médias e respectivos desvios padrão. As repetições 5 e 6 foram realizadas em períodos mais quentes, resultando em temperaturas mais elevadas, porém não foi observada a ocorrência de desova.

Tabela 6: Valores de temperatura obtidos durante o processo de depuração.

Tempo	0h	12h	18h	24h	36h	48h	Média ± σ
Repetição 1	23,2	22,2	22,5	23	22,5	23,5	22,8 ± 0,5
Repetição 2	20,5	21,5	21,5	22,5	23,2	23,5	22,1 ± 1,1
Repetição 3	22,5	22,5	22,5	22,5	21,2	20,6	22,0 ± 0,8
Repetição 4	22,5	22,9	21,9	22,1	21,2	21,4	22,0 ± 0,6
Repetição 5	23,4	24,5	25,1	24,2	25,1	24,8	24,5 ± 0,6
Repetição 6	25,1	26,8	26,2	25,2	25,1	23,5	25,3 ± 1,1

4.1.3 Oxigênio dissolvido

A concentração de oxigênio dissolvido na água também foi avaliada durante a depuração e permaneceu constante, na faixa de 6,4 mg/L de O₂. Tendo em vista que a quantidade de água na depuradora, a quantidade de ostras nas cestas e a vazão da água foram mantidas constantes em todos os experimentos, esse parâmetro não foi avaliado em todas as repetições.

4.2 Ensaios Microbiológicos

Segundo a Instrução Normativa Interministerial No 7, de 8 de maio de 2012 do Ministério da Pesca e Agricultura, as áreas passíveis de depuração são aquelas que apresentam contaminação entre 230 e 46000 NMP/110g de carne de molusco. Tendo em vista esses valores, foram realizadas quatro repetições com o inóculo inicial entre 230 e 46000 NMP/100g de carne para verificar a eficiência da depuração em uma contaminação real. Os resultados obtidos dessas análises estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Valores de NMP obtidos a cada ciclo de depuração.

Tempo	Valores de <i>E. coli</i> em NMP/100g de ostra			
	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Repetição 4
0h	35000	11000	5400	5400
12h	24000	5400	330	460
18h	790	330	490	1100
24h	230	330	1300	330
36h	70	110	170	230
48h	20	170	20	20

Porém, para verificar se a redução da *E. coli* se mantinha mesmo com uma carga microbiana de concentração mais elevada, também foram realizadas mais duas repetições, testando a capacidade de depuração com o inóculo muito acima de uma contaminação real. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Valores obtidos nas depurações com inóculo de maior concentração.

Tempo	Valores de <i>E.coli</i> em NMP 100/g de ostra	
	Repetição 5	Repetição 6
0h	160000	350000
12h	16000	24000
18h	7000	1300
24h	9200	700
36h	940	460
48h	790	490

Em todas as repetições observou-se já nas primeiras 12h uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos níveis de contaminação. Essa redução também ocorreu no período de 12h para 18h nas repetições com maior inóculo (1,2,5 e 6), conforme pode ser observado na Tabela 7.

Entre 12h e 18h, 18h e 24h e 24h e 36h, a concentração de *E. coli* não apresentou diferenças significantes, ainda que quando avaliada a diferença entre os tempos 12h e as 36h essa redução tenha sido significativa ($p < 0,03$). No entanto, em todas as repetições, após as 48h, os valores de NMP de *E. coli* obtidos apresentam redução estatisticamente significativa, com $p < 0,001$ segundo os resultados que podem ser observados nos gráficos das figuras 13 e 14.

Figura 13: Concentração de *E. coli* em NMP/100g no início e ao final da depuração das repetições 1, 2, 3 e 4 respectivamente.

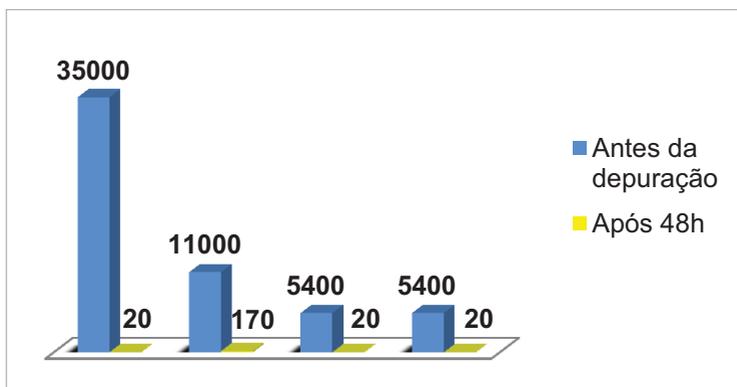
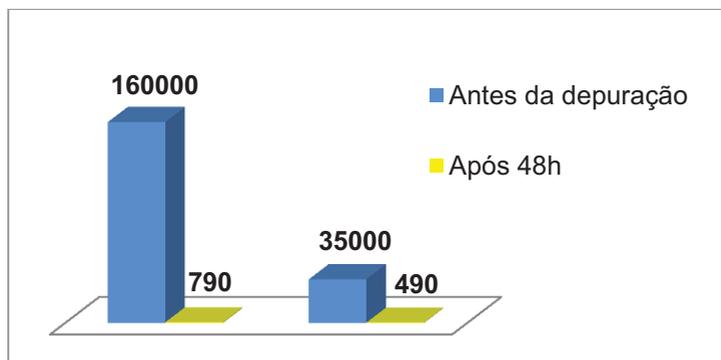


Figura 14: Concentração de *E. coli* em NMP/g no início e ao final da depuração das repetições 5 e 6 respectivamente.



Após 48h de depuração, a quantidade de *E. coli* encontrada na carne das ostras nas repetições de 1 a 4 foi reduzida até os níveis previstos pela Instrução Normativa Interministerial No 7, de 8 de maio de 2012 do Ministério da Pesca e Agricultura, compatíveis com áreas de retirada liberada para consumo sem necessidade de processamento, como pode ser observado no gráfico da figura 13, comprovando a eficácia da depuração, sendo que nas repetições 1,2 e 3 esse nível foi atingido já com 36h de depuração. Cabe ressaltar que os testes foram executados com a capacidade máxima da depuradora, ou seja, 60 dúzias de ostras.

Nas repetições com concentrações elevadas de *E. coli*, também se observou redução significativa nos níveis de contaminação após 48h, com variações menos marcantes a medida que a carga microbiana diminuiu, como pode ser observado na tabela 8.

Pelos resultados obtidos neste experimento e por outros dados disponíveis na literatura (NAPPIER et al, 2009; LOVE et al, 2010; RONG et al, 2013), não se pode questionar a importância e a eficiência do processo de depuração na eliminação de bactérias contaminantes, porém cabe também refletir sobre os parâmetros exigidos para garantir a segurança alimentar dos moluscos.

De acordo com a atual legislação, as áreas de cultivo devem ser monitoradas de modo a permitir ou não a retirada de moluscos para comercialização. Tendo em vista a relação entre a presença de *Escherichia coli* e a contaminação fecal, esse foi o micro-organismo escolhido como indicador para o monitoramento, porém talvez essa não seja a escolha mais adequada.

Para avaliar a eficiência da bactéria *Escherichia coli* como indicadora de contaminação fecal em moluscos, Marino et. al (2005) utilizaram mexilhões contaminados artificialmente com *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* não-O1 e *Enterococcus durans*. O tempo de depuração de cada um dos micro-organismos foi avaliado individualmente e sob influência dos demais micro-organismos, em duas temperaturas diferentes (14°C e 21°C). Quando houve a contaminação com as três espécies, observou-se que a *E. coli* sozinha não foi detectável em ambas as temperaturas após 144h de depuração. Quando na mistura dos micro-organismos, a 14°C a *E. coli* não foi detectada após 168h, porém a 21°C os níveis dessa bactéria não puderam mais ser detectados após 72h, indicando uma rápida depuração. O mesmo comportamento não foi observado para o *Vibrio cholerae* não-O1, que ainda foi detectado após 168h nas duas temperaturas, quando em conjunto com os outros dois micro-organismos e sozinho na temperatura de 21°C, ainda que somente o *Vibrio cholerae* não-O1 tenha sido eliminado em 168h a 14°C. Para *Enterococcus durans*, houve diminuição no nível de contaminação, porém sua presença ainda foi detectada após 168h de depuração, tanto sozinho como quando em associação com os outros dois micro-organismos para ambas as temperaturas.

Em 2002, Croci et al, avaliou a taxa de depuração em ostras para *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* O1 e *Vibrio parahaemolyticus*. Nesse experimento, as ostras foram divididas em dois grupos, sendo que

um deles foi contaminado com para *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae* e o outro com *Escherichia coli* e *Vibrio parahaemolyticus*. Amostras foram coletadas com 5h, 24h e 44h de depuração e se realizaram os ensaios microbiológicos para enumeração dessas bactérias. A quantidade de *E. coli* caiu rapidamente de $1,1 \times 10^5$ NMPg⁻¹ para $4,6 \times 10^3$ NMPg⁻¹ após 5h de depuração, atingindo um valor de $2,4 \times 10^2$ NMPg⁻¹ ao final do experimento. No entanto, o mesmo comportamento não foi observado para as duas espécies de vibrio. A quantidade de *Vibrio cholerae* O1 permaneceu praticamente constante durante as primeiras 5 horas e só decaiu um log ao final do experimento, passando de $9,3 \times 10^3$ NMPg⁻¹ para $9,3 \times 10^2$ NMPg⁻¹. O *Vibrio parahaemolyticus* também não sofreu reduções muito significativas durante as primeiras 24h de depuração, passando de $7,4 \times 10^3$ NMPg⁻¹ para $1,1 \times 10^3$ NMPg⁻¹ após 44h. Considerando esses dados, se observa que mesmo após 44h de depuração ainda foi possível detectar uma quantidade significativa de vibrios. No entanto, esse trabalho mostrou que a *E.coli* pode, nas condições deste experimento, atingir níveis aceitáveis para consumo em tempos inferiores a 44h.

Esses dados reforçam estudos (SON & FLEET, 1980; TAMPLIN & CAPERS, 1992; LEE & YOUNGER, 2002) que demonstram que as taxas de eliminação de vibrios não são comparáveis às de indicadores de contaminação fecal como a *Escherichia coli*. Sabendo que a grande maioria dos surtos alimentares ligados a frutos do mar e causados por bactérias estão relacionados aos vibrios, alerta-se para necessidade da enumeração desses micro-organismos ou busca de outro indicador mais adequado que possibilite o controle dessas bactérias em ostras e outros produtos de origem marinha. (RIPABELLI, 1999)

Além das bactérias da família *Vibrionaceae*, os vírus entéricos também são responsáveis por um grande número de casos de DTA's (GOSLING, 2003) envolvendo água e frutos do mar e a utilização de *E.coli* como indicador também pode ser ineficiente para determinar a presença de vírus, visto que os vírus patogênicos, tais como o vírus da hepatite A (HAV), rotavírus, e enterovírus já foram detectados em mexilhões de áreas que, segundo critérios de qualidade bacteriológica, foram consideradas como não contaminadas, seguras para a natação e adequadas à retirada de mariscos (BOSCH, 1994; MUNIAIN-MUJICA, 2002; SCHWAB, 1998).

Em outro estudo, realizado na região da Galícia, Espanha (ROMALDE, 2002), comparou-se a prevalência de *E. coli* e do vírus da

hepatite A (HAV) em ostras e não foi encontrada correlação significativa entres eles, o que evidencia que a *E. coli* talvez não seja o indicador mais adequado para o monitoramento de áreas de cultivo.

Para avaliar a eficiência da depuração, outros fatores devem ainda ser considerados, como a salinidade, temperatura e a quantidade da contaminação inicial, bem como a natureza dessa contaminação, pois cinéticas de acumulação e depuração diferentes são observadas para diferentes micro-organismos ou quando um mesmo micro-organismo está isolado ou interagindo com outros contaminantes. Além disso, moluscos contaminados artificialmente apresentam uma velocidade de depuração mais rápida do que os naturalmente contaminados (OLIVEIRA, 2011; GOSLING, 2003). Isso pode ser consequência da uma maior adaptação ao ambiente da célula bacteriana naturalmente presente, o que não ocorre se a bactéria é introduzida artificialmente a partir de uma cultura produzida em laboratório.

Em face dessas considerações, mais experimentos devem ser conduzidos para que se permita avaliar o tempo mínimo necessário de depuração para tornar os bivalves realmente livre de patógenos, levando em consideração os micro-organismos nativos no ambiente marinho que não estão relacionados à contaminação fecal, bem como vírus e protozoários, que possuem velocidades de depuração muitas vezes distintas das bactérias. Também cabe questionar se a atual legislação para monitoramento das águas de cultivo através da quantificação somente de *Escherichia coli* é suficiente e adequada, considerando os problemas mais frequentes associados ao consumo de moluscos bivalves.

5 CONCLUSÕES

Por serem consumidas frequentemente *in natura*, as ostras apresentam riscos microbiológicos ao consumidor, necessitando que se tomem medidas para reduzir esses perigos associados ao consumo. Este trabalho procurou avaliar o processo de descontaminação de ostras por depuração com luz ultravioleta em um sistema compacto e através dos experimentos realizados pôde ser observado que a depuração foi eficaz na descontaminação de *Crassostrea gigas*, sendo capaz de reduzir o número de bactérias presentes na carne dos moluscos, nas condições deste trabalho, sendo que a depuração se mostrou efetiva tanto em amostras pouco contaminadas quanto em amostras altamente contaminadas.

Também foi observado que após 48 horas de depuração, a quantidade de *E. coli* na carne dos moluscos já atingiu níveis aceitáveis nas 4 repetições com inóculo entre 230 e 46000 NMP/100g de carne (faixa limitante estabelecida pela Instrução Normativa Interministerial No 7, de 8 de maio de 2012 do Ministério da Pesca e Agricultura, para depuração).

No entanto, analisando trabalhos anteriores, se conclui que a baixa contagem de *E. coli* nem sempre garante um produto livre de patógenos e, em vista disso, seria necessário realizar estudos mais abrangentes com outros micro-organismos além de *E.coli* e observar a velocidade de depuração para cada um deles, principalmente para espécies de vibrios em amostras naturalmente contaminadas. Também é necessário repensar sobre os atuais padrões para o cultivo de moluscos e verificar se eles realmente são suficientes para garantir um produto seguro ou se deveria ser exigido um padrão mais rigoroso para o monitoramento dos cultivos.

-

6 REFERÊNCIAS

ABAD, F. et al. Viruses in Mussels: Public Health Implications and Depuration. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 6, p. 677-681, 1997.

APHA, **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4ª edição. American Public Health Association, 2001. 675p.

BARRY, A. Ecological Aquaculture: The Evolution of the Blue Revolution. **Blackwell Science Ltd.**, 2002. 400p.

BEGUM, M., HOCKING, A. MISKELLY, D. Inactivation of food spoilage fungi by ultra violet (UVC) irradiation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 74–77, 2009.

BINTSIS, T., LITOPOULOU-TZANETAKI, E., ROBINSON, R. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – a critical review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p 637-645, 2000.

BINTSIS, T., LITOPOULOU-TZANETAKI, E., ROBINSON, R.K. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – a critical review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p.637-645, 2000.

BOSCH, A. et. al. Should shellfish be purified before public consumption? **The Lancet**, v. 334, p. 1024-1025, 1994.

BRANDS, D. et. al. Prevalence of *Salmonella* spp. in Oysters in the United States. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 2, p. 893–897, 2005.

BRASIL, Decreto n. 5.564, de 19 de Outubro de 2005. Institui o Comitê Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves. **Diário Oficial da União**, n. 202, p. 2, 20 de Outubro de 2005.

BRASIL, Ministério da Pesca e Aquicultura, Instrução Normativa Interministerial N°7, **Diário Oficial da União**, p. 55-59. Brasília, 8 de maio de 2012.

BRASIL. Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II e III. **Diário Oficial**. Brasília, 1 de janeiro de 2001.

BUTT, A., ALDRIDGE, K., SANDERS, C. Infections related to the ingestion of seafood. Part I: viral and bacterial infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v.4, p. 201-212, 2004.

COELHO C. et al. Hepatitis A virus detection in oysters (*Crassostrea gigas*) in Santa Catarina State, Brazil, by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v.66, n.3, p.507–511, 2003.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução 357 de 17 de março de 2005. **Diário Oficial**. Brasília, 18 março de 2005.

CORRÊA, A. et. al. Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. **Marine Environmental Research**, v. 63, p.479–489, 2007.

CROCI, L. et al., Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Applied Microbiology**, n. 92, p. 460-465, 2002.

CROCI, L. et. al. Contamination of mussels by hepatitis A virus: a public-health problem in southern Italy. **Food Control**, v 14, p. 559–563, 2003.

DARAMOLA, B.A; WILLIAMS, R.; DIXON R. In vitro antibiotic susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* from environmental sources in Northern England. **International journal of antimicrobial agents**. v. 34 (5), p. 499-500, 2009.

DEPAOLA, A. et.al. Bacterial and Viral Pathogens in Live Oysters: 2007 United States Market Survey. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 9, p. 2754–2768, 2010,

DORE, W., LEES, D. Behavior of *Escherichia coli* and Male-Specific Bacteriophage in Environmentally Contaminated Bivalve Molluscs before and after Depuration. **Applied and environmental microbiology** n. 8, v. 61, p. 2830–2834, 1995.

DUNHAM, R. A. Aquaculture and Fisheries Biotechnology and Genetics, 2nd Edition. Cambridge. **CAB International**, 2011. 495p.

ENGELL, R.; SANMAN, E.; LIM, S.; MOZAFFARIAN, D. Seafood omega-3 intake and risk of coronary heart disease death: an updated meta-analysis with implications for attributable burden. **The Lancet**, v.381, p.45, 2013.

FELDHUSEN, F. T. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 13, p. 1651-1660, 2000.

FERREIRA, J.F & MAGALHAES, A.R.M. Cultivo de mexilhões. In POLI, C.R.,POLI, A.T.B.; ANDREATA, E. & BELTRAME, E. Aquicultura: Experiências Brasileiras. **Multifatorial Editora**. Florianopolis, 456 p.,2004.

FERREIRA, J.F. & OLIVEIRA-NETO, F.M., 2007. Cultivo de Moluscos em Santa Catarina. [online] Disponível em: <http://www.cca.ufsc.br/~jff/disciplinas/cultivodemoluscos/pdf/Cultivo%20de%20Moluscos%20em%20Santa%20Catarina%202006.pdf>. Acesso em: 07/05/2013

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) 2011. **Species Fact Sheets: *Crassostrea gigas***. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/species/3514/en> Acesso em: 20/08/2012

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **FAO Yearbook: Fishery and Aquaculture Statistics** Rome, FAO. 2011. 321p. Disponível em:

ftp://ftp.fao.org/FI/CDrom/CD_yearbook_2009/root/aquaculture/yearbook_aquaculture.pdf. Acesso: 20/08/2013.

FORREST, B. et. al. Bivalve aquaculture in estuaries: Review and synthesis of oyster cultivation effects. *Aquaculture*, v. 298, p. 1–15, 2009.

GOMEZ-BAUTISTA, M. et. al. Detection of Infectious *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and Cockles (*Cerastoderma edule*). **Applied and environmental microbiology**, v.66, n. 5, p. 1866–1870, 2000.

GOSLING, E. **Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture**. Fishing News Books, 2003. 443p.

HASSEN, A. et al. UV disinfection of treated wastewater in a large-scale pilot plant and inactivation of selected bacteria in a laboratory UV device. *Bioresource Technology*, v 74, p 141-150, 2000.

HIJNEN, W., BEERENDONK, M., MEDEMA, G. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. **Water Research**, v. 40, p. 3-22, 2006.

HIJNEN, W.A.M., BEERENDONK, E.F., MEDEMA G.J. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan oocysts in water: A review. **Water Research**, v. 40, p. 3 – 22, 2006.

IWAMOTO, M. et. al. Epidemiology of Seafood-Associated Infections in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23, p 399–411, 2010.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6° edição. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 711p.

KAPER, J.B., NATARO, J. P.,MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature reviews : Microbiology**, v.2, p. 123-140, 2004.

KARL, G. et al. UV Disinfection of *Giardia lamblia* Cysts in Water. **Environmental. Science & Technology**, v. 36, p. 2519-2522, 2002.

KROMHOUT1, D.; YASUDA, S. ; GELEIJNSE1, J.; SHIMOKAWA, H. Fish oil and omega-3 fatty acids in cardiovascular disease: do they really work? **European Heart Journal**, v. 33, p. 436-443, 2012.

LE GUYADER, F. et. al. Detection of Multiple Noroviruses Associated with an International Gastroenteritis Outbreak Linked to Oyster Consumption. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 11, p. 3878–3882, 2006.

LEE, R., YOUNGER, A. Developing microbiological risk assessment for shellfish purification. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 50, p. 177–183, 2002.

LEE, R; LOVATELLI, A., ABABOUC, L. Bivalve Depuration: Fundamental and Practical Aspects. **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO)**. Rome, 2008. 140p.

LINDEN, K. G. et al. UV Disinfection of *Giardia lamblia* Cysts in Water. **Environmental Science. Technology**, v. 36, p. 2519-2522, 2002.

LOVE, D., LOVELACE, G., SOBSEY, M. Removal of *Escherichia coli*, *Enterococcus fecalis*, coliphage MS2, poliovirus, and hepatitis A virus from oysters (*Crassostrea virginica*) and hard shell clams (*Mercinaria mercinaria*) by depuration. **International Journal of Food Microbiology**, v.143, p 211–217, 2010.

MAALOUF, H, POMMEPUY, M., LE GUYADER, F. Environmental Conditions Leading to Shellfish Contamination and Related Outbreaks. **Food Environmental Virology**, v 2, p.136–145, 2010.

MCMANUS, A.; TAYLOR, J.; NICHOLSON, C. Health benefits of seafood: A review of resources available to General Practitioners and Allied Health Professionals. **Centre of Excellencescience Seafood Health**, 2009, 33p.

MARINO, A. et al. Uptake of *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* non-O1 and *Enterococcus durans* by, and depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **International Journal of Food Microbiology**, v 99, p 281– 286, 2005.

MARTINEZ-URTAZA et. al. Identification of *Salmonella* Serovars Isolated from Live Molluscan Shellfish and Their Significance in the Marine Environment. **Journal of Food Protection**. v. 66, n.2, p. 226-232, 2003.

MCKINDSEY, C. et. al. Bivalve Aquaculture and Exotic Species: A Review of Ecological Considerations and Management Issues. **Journal of Shellfish Research**, v. 26, n. 2, p. 281–294, 2007.

BRASIL, MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2010**. Brasília, 2012. 128p. Disponível em: http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf. Acesso em: 20/08/2013.

MORRISON, C. M. et al. Survival of *Salmonella* Newport in oysters. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, p. 93-98, 2011.

MUNIAIN-MUJICA, I. et. al. Depuration dynamics of viruses in shellfish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 125–133, 2002.

NAPPIER, S., GRACZYK, T., SCHWAB, K. Bioaccumulation, Retention, and Depuration of Enteric Viruses by *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis* Oysters. **Applied and environmental microbiology**, v.74, n. 22, p. 6825–6831, 2008.

NEWKIRK, G. Sustainable coastal production systems: a model for integrating aquaculture and fisheries under community management. **Ocean & Coastal Management**, v. 32, n. 2, p. 69-83, 1996.

NÚCLEO DE ESTUDOS EM ECONOMIA DO MEIO AMBIENTE (NEEMA), **Difusão de Tecnologias Sustentáveis**, 2008. Disponível

em: <http://www.neema.ufc.br/Sistemas%20de%20cultivo.html>. Acesso em: 20/08/2013.

OLIVEIRA, J. et al. Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives. **Food Control**, v.22, p. 805-816, 2011.

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

PAILLARD, C., LE ROUX, F., BORREGO, J. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. **Aquatic Living Resources**, v 17, p. 477–498, 2004.

PAREJO, C. **Moluscos: Tecnologia de Cultivo**. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 1989. 167p.

PRIMAVERA, J. H. Overcoming the impacts of aquaculture on the coastal zone. **Ocean & Coastal Management**, v. 49, p. 531-545, 2006.

RAMOS, R. J. ***Vibrio sp.* em ostras e águas de áreas de cultivo da Baía Sul de Santa Catarina: ocorrência, caracterização feno e genotípica, suscetibilidade antimicrobiana e depuração**. 2012. 146p. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

RIPABELLI, G. et. al. Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v 49, p. 43–48, 1999.

ROMALDE, J. L. et al. Prevalence of enterovirus and hepatitis A virus in bivalve molluscs from Galicia (NW Spain): inadequacy of the EU standards of microbiological quality. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 119-130, 2002.

RONG, R.; LIN, H.; WANG, J.; KHAN, M.; LI, M. Reductions of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after bacteriophage application during depuration. **Aquacultur**, 2013.

ROWSE, A., FLEET, G. Effects of Water emperature and Salinity on Elimination of *Salmonella charity* and *Escherichia coli* from Sydney Rock Oysters(*Crassostrea commercialis*). **Applied and environmental microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1061-1063,1984.

SANTOS, A. et. al. **Síntese informativa da maricultura 2011 (mexilhões, ostras e vieiras)**. Epagri/Cedap. Florianópolis, 2011.

SANTOS, A. et. al. **Síntese Informativa da Maricultura 2012 (mexilhões, ostras e vieiras)**. Epagri/Cedap. Florianópolis, 2012.

SCHWAB, K. et al. Distribution of Norwalk Virus within Shellfish Following Bioaccumulation and Subsequent Depuration by Detection Using RT-PCR. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 12, p. 1674-1680, 1998.

SOUZA et. al. Controle Higiénico Sanitário de Moluscos Bivalves no Estado de Santa Catarina. **Panorama da Aquicultura**, p. 55-59, nov-dez, 2009.

SOUZA FILHO, J. et al. Custo de produção da ostra cultivada. Florianopolis: Instituto Cepa/SC. **Cadernos de indicadores agrícolas**, 23 p., 2003.

SUPLICY, F. M. **Ensaio sobre a depuração do mexilhão *Perna perna* (L., 1758)**. 1998. 81 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

SUPLICY,F.M et al. Modelling of filter-feeding behavior on the brown mussel *Perna perna* (L.)exposed to natural variation of seston avaiability in Santa Catarina, Brazil. **Journal of Shellfish Research**, v.22, p. 125-134, 2003.

TAMPLIN, M.,CAPERS, G. Persistence of *Vibrio vulnificus* in Tissues of Gulf Coast Oysters,*Crassostrea virginica*, Exposed to Seawater Disinfected with UV Light. **Applied and environmental microbiology**, v. 58, n. 5, p. 1506-1510, 1992.

THI SON, N., FLEET, G. Behavior of Pathogenic Bacteria in the Oyster, *Crassostrea commercialis*, During Depuration, Re-laying, and Storage. **Applied and environmental microbiology**, v. 40,n.6, p. 994-1002, 1980.

VALENTE, L. et. al. Manuais de Maricultura; Cultivo de Ostras. **Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca, 2012. Disponível em:** <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABbH4AJ/manual-criacao-ostras>

VOULTSIADOU, E., KOUTSOUBAS, D., ACHPARAKI, M. Bivalve mollusc exploitation in Mediterranean coastal communities: an historical approach. **Journal of Biological Research-Thessaloniki**, v.12, p. 1-11, 2009.