



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Vilaine Corrêa da Silva

**Distribuição viral, desinfecção e valoração nutricional de ostras *Crassostrea gigas*
bioacumuladas e depuradas na presença de produtos naturais**

Florianópolis
2022

Vilaine Corrêa da Silva

**Distribuição viral, desinfecção e valoração nutricional de ostras *Crassostrea gigas*
bioacumuladas e depuradas na presença de produtos naturais**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gislaine Fongaro
Coorientadora: Dr^ª. Doris Sobral Marques Souza

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra

Corrêa da Silva, Vilaine

Distribuição viral, desinfecção e valoração nutricional de ostras *Crassostrea gigas* bioacumuladas e depuradas na presença de produtos naturais / Vilaine Corrêa da Silva ; orientador, Gislaine Fongaro, coorientador, Doris Sobral Marques Souza, 2022.

93 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Biotecnologia e Biociências. 3. Virologia Ambiental. 4. Norovirus. 5. Ostras. I. Fongaro, Gislaine. II. Sobral Marques Souza, Doris. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Vilaine Corrêa da Silva

**Distribuição viral, desinfecção e valoração nutricional de ostras *Crassostrea gigas*
bioacumuladas e depuradas na presença de produtos naturais**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^ª. Dr^ª. Vívian Maria Burin

Universidade Federal de Santa Catarina

(Membro Titular Externo)

Prof^ª. Dr^ª. Izabella Thaís da Silva

Universidade Federal de Santa Catarina

(Membro Titular Interno)

Prof. Dr. Juliano de Dea Lindner

Universidade Federal de Santa Catarina

(Membro Suplente Interno)

Prof. Dr. William Michelin

Universidade do Contestado

(Membro Suplente Externo)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de mestre em biotecnologia e biociências.

Professor Dr. Glauber Wagner
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Professora Dr^ª. Gislaïne Fongaro
Orientador(a)

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado aos meus amados pais, ao meu namorado, a minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de chegar até aqui e ter concluído este trabalho. Agradeço aos meus queridos e amados pais que me apoiaram e me incentivaram em todos os sentidos nessa caminhada, sempre com muito amor, carinho e acolhimento. Pai, obrigada por ser tão amoroso e me fazer acreditar sempre no meu potencial, obrigada por ser esse exemplo de pessoa batalhadora, justa e cheia de alegria na vida. Mãe, sou imensamente grata por ter você ao meu lado, sempre me fazendo ver o lado bom de todas as coisas e fases da vida, você sempre me dá forças e milhões de motivos para continuar sempre em frente em busca dos meus sonhos e objetivos. Sou muito amada e acolhida por vocês e isso faz de mim uma pessoa cada vez mais forte e feliz. Roberto, quero agradecer a você meu amor, por estar ao lado em todos os momentos e fazer de mim uma pessoa melhor a cada dia, aprendo muito contigo todos os dias e com você eu aprendi o significado da palavra companheirismo, porque mais do que meu namorado, você é meu companheiro de vida, meu amigo, meu amor, obrigada pela paciência e incentivo sempre. E de forma geral gostaria de agradecer também aos meus familiares e amigos por todo carinho e cuidado em toda a minha trajetória.

Agradeço à CAPES pelo fornecimento de minha bolsa e pelos demais financiamentos que possibilitaram a realização deste projeto. Sou grata as parcerias que foram realizadas no decorrer deste projeto. Ao Laboratório de Moluscos Marinhos da UFSC, em especial ao Josué e Carlos, por fornecer e ajudar nas coletas de ostras e água do mar, sem vocês este projeto não seria possível. Ao departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC, professora Dra. Vivian Maria Burin, professor Dr. Juliano de Dea Lindner, mestrandas Thalita Isabel Assumpção. Ao professor Roberto Degenhardt, coordenador do Curso de Ciências Biológicas da Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus de Joaçaba.

A minha orientadora Dra. Gislaíne Fongaro por sempre acreditar em mim e abrir as portas do LVA, me acolhendo e dando todo o suporte necessário. Sempre disponibilizando oportunidades em que me fizeram crescer não só como profissional, mas como ser humano também. Obrigada por ser esse exemplo de mulher forte e batalhadora, mostrando que somos capazes de realizar tudo o que sonhamos. Te admiro muito. Agradeço também as professoras Dra. Izabella Thaís da Silva e Dra. Ariadne Cristine Cabral da Cruz por todos os ensinamentos, carinho e cuidado sempre.

Meu agradecimento especial é para a minha coorientadora Doris, que desde o primeiro dia foi para a bancada comigo e compartilhou todo o seu conhecimento, sempre com muita paciência, seriedade e dedicação. E que mais que conhecimento e ensinamentos, me cuidou e

estive ao meu lado durante toda esta trajetória. Obrigada Dóris por tudo, és uma pessoa muito especial em minha vida, és uma amiga para mim da qual vou levar pra sempre comigo em meu coração.

Agradeço também aos meus colegas do LVA, em especial aos que ajudaram mais ativamente em meus experimentos, Jacqueline, Mariana e Beatriz. Shirley e Jacqueline, vocês mais que colegas, se tornaram minhas amigas, pessoas em que sou muito grata e feliz por ter encontrado nessa trajetória. Vocês deixaram meus dias mais leves e alegres.

E por fim, quero agradecer a mim mesma por persistir e continuar em frente sempre, por ter coragem e buscar caminhos para realizar meus sonhos. Obrigada mais uma vez a Deus e ao universo por me rodear de pessoas tão boas e especiais que me fazem crescer, amadurecer, e que me trazem ensinamentos e me proporcionam alegrias.

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê (SCHOPENHAUER, Arthur, 1851).

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi estudar a distribuição tecidual de contaminantes virais e desempenho da desinfecção e valoração nutricional de ostras *Crassostrea gigas*, mediado pelo processo de depuração associado a produtos naturais. Para testes de avaliação da distribuição viral do norovírus murino (MNV-1) e bacteriófagos (colifagos somáticos e F-específicos), ostras foram alocadas em aquário com água do mar natural e 5×10^3 Unidade Formadora de Placas (UFP) de colifagos somáticos e F-específicos e 7×10^9 UFP de MNV-1. Para cada teste, três ostras foram coletadas de cada aquário nos tempos de 0, 4, 6 e 24 horas após a adição dos bacteriófagos e do MNV-1. As ostras tiveram seu manto (MT), brânquias (BR) e tecido digestivo (TD) dissecados. Para o teste de distribuição de fagos, as amostras foram eluídas em TPB (Tampão de Fosfato de Triptose), e os fagos foram quantificados nos tecidos usando a técnica de duplo ágar. Para o MNV-1, cada pool foi submetido à concentração viral por polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). A distribuição de MNV-1 em MT, BR e TD foi medida por ensaio de placa de lise (UFP de vírus infecciosos) e cópias de genes (CG) por RT-qPCR. Para a avaliação da inativação de norovírus (NoV) e bactérias por *Curcuma longa* e *Planktochlorella nurekis* em ostras *Crassostrea gigas* vivas. Ostras foram bioacumuladas com MNV-1 e *Escherichia coli* e submetidas ao processo de depuração, associado a *Curcuma longa* e *Planktochlorella nurekis*. Cada amostra (pool de três ostras) tiveram seus tecidos digestivos (TD) dissecados. As amostras foram submetidas à concentração de MNV-1 usando polietilenoglicol 6000. A quantificação viral foi realizada por Placa de Lise (UFP) e RT-qPCR (CG), respectivamente. Para a quantificação de bactérias, alíquotas de 100 μ L nas diluições 10^{-2} e 10^{-4} foram inoculadas em placa com meio LB e placa com meio Maconkey e depois de 48 horas foi realizada a contagem das colônias. Os parâmetros físico-químicos da água dos aquários foram monitorados durante todos os ensaios. Para análise nutricional, ostras foram submetidas a bioacumulação com os produtos naturais por 24 horas e posteriormente foi analisado umidade, cinzas, gordura e proteína, teor de polifenóis totais e atividade antioxidante. Os resultados para a distribuição de MNV e bacteriófagos mostraram maior concentração de colifagos somáticos em MT e em BR de fagos F-específicos. As partículas infecciosas de MNV-1 apresentaram maiores contagens no TD. A bioacumulação com MNV-1 e bactérias usando o processo de depuração associado a *Curcuma longa* e *Planktochlorella nurekis*, apontou para redução viral de $1 \log_{10}$ até $2 \log_{10}$ no TD das ostras. Após as 24 horas de bioacumulação com os produtos naturais, as ostras *Crassostrea gigas* apresentaram melhora nutricional significativa em sua composição centesimal, no teor de polifenóis e atividade antioxidante. Com os resultados obtidos, pode-se afirmar que *Curcuma longa* e *Planktochlorella nurekis*, de forma geral apresentaram benefícios antivirais e antibacterianos não apresentando toxicidade para as ostras. E ainda, valorizando as ostras comercialmente e nutricionalmente.

Palavras-chave: *Crassostrea gigas*; inativação de vírus; aquicultura.

ABSTRACT

The objective of this research was to study the tissue distribution of viral contaminants and disinfection performance and nutritional valuation of *Crassostrea gigas* oysters, mediated by the purification process associated with natural products. To evaluate the viral distribution of murine norovirus (MNV-1) and bacteriophages (somatic and F-specific coliphages), oysters were placed in an aquarium with natural seawater and 5×10^3 Plaque Forming Unit (PFU) of somatic coliphages and F-specific and 7×10^9 PFU of MNV-1. For each test, three oysters were collected from each aquarium at 0, 4, 6 and 24 hours after the addition of bacteriophages and MNV-1. The oysters had their mantle (MT), gills (GL) and digestive tissue (DT) dissected. For the phage distribution test, samples were eluted in TPB (Tryptose Phosphate Buffer), and phages were quantified on tissues using the double agar technique. For MNV-1, each pool was subjected to viral concentration by polyethylene glycol 6000 (PEG 6000). The distribution of MNV-1 in MT, GL and DT was measured by plaque lysis assay (PFU of infectious viruses) and gene copies (GC) by RT-qPCR. For the evaluation of inactivation of norovirus (NoV) and bacteria by *Curcuma longa* and *Planktochlorella nurekis* in live *Crassostrea gigas* oysters. Oysters were bioaccumulated with MNV-1 and *Escherichia coli* and submitted to the purification process, associated with *Curcuma longa* and *Planktochlorella nurekis*. Each sample (pool of three oysters) had their digestive tissues (DT) dissected. Samples were subjected to MNV-1 concentration using polyethylene glycol 6000. Viral quantification was performed by Lysis Plate (PFU) and RT-qPCR (GC), respectively. For the quantification of bacteria, 100 μ L aliquots at dilutions 10^{-2} and 10^{-4} were inoculated onto a plate with LB medium and a plate with Maconkey medium and after 48 hours the colonies were counted. The physical-chemical parameters of the aquarium water were monitored during all tests. For nutritional analysis, oysters were subjected to bioaccumulation with natural products for 24 hours and then moisture, ash, fat and protein, total polyphenol content and antioxidant activity were analyzed. The results for the distribution of MNV and bacteriophages showed higher concentration of somatic coliphages in MT and in GL of F-specific phages. Infectious MNV-1 particles had higher counts in DT. Bioaccumulation with MNV-1 and bacteria using the purification process associated with *Curcuma longa* and *Planktochlorella nurekis*, pointed to a viral reduction of $1 \log_{10}$ to $2 \log_{10}$ in the DT of oysters. After 24 hours of bioaccumulation with natural products, *Crassostrea gigas* oysters showed significant nutritional improvement in their proximate composition, polyphenol content and antioxidant activity. With the results obtained, it can be affirmed that *Curcuma longa* and *Planktochlorella nurekis*, in general, presented antiviral and antibacterial benefits, not showing toxicity to oysters. And yet, valuing oysters commercially and nutritionally.

Keywords: *Crassostrea gigas*; virus inactivation; aquaculture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais estruturas anatômicas da <i>Crassostrea gigas</i>	17
Figura 2 – a) Estrutura do capsídeo de NoV, b) Estrutura dos domínios Shell, Protruding 1 e Protruding 2, c) Organização das três fases de leitura aberta ou ORFs: ORF1, ORF2 e ORF3	21
Figura 3 – Fagos classificados com base na morfologia e material genético (DNA de fita dupla: dsDNA, RNA de fita simples: ssRNA e DNA de fita simples: ssDNA). (A) fagos com cauda, (B) fago icosaédrico, (C) fago filamentosos	25
Figura 4 – Resumo gráfico da metodologia, apresentando a produção viral, seguido de bioacumulação viral e análises de tecidos provenientes de ostras vivas	33
Figura 5 – Distribuição de MNV-1 em ostras <i>C. gigas</i> após bioacumulação viral realizada em aquários, onde CG é a quantificação de cópias de genes, e UFP é o número de unidades formadoras de placa infecciosas	38
Figura 6 – Distribuição de fagos F- específicos (MS2) e fagos Colifagos somáticos (ϕ X) em ostras <i>C. gigas</i>	39
Figura 7 – Resumo gráfico da metodologia, apresentando a bioacumulação viral e bacteriana, bem como o processo de depuração associado a <i>C. longa</i> e <i>P. nurekis</i> e análises de tecidos provenientes de ostras vivas	43
Figura 8 – Teste de solubilidade de <i>C. longa</i> em água marinha utilizando três concentrações 0,1 mg/mL; 0,025 mg/mL e 0,625 mg/mL em 100 mL de água marinha, respectivamente	44
Figura 9 – Efeito virucida do extrato de alga <i>P. nurekis</i> em MNV-1, onde UFP é o número de unidades formadoras de placas	52
Figura 10 – Experimento de inativação de MNV-1 em água marinha com <i>C. longa</i>	53
Figura 11 – Experimento bioacumulação e inativação de MNV-1 em ostras <i>C. gigas</i> associado a solução aquosa de <i>C. longa</i> e extrato de alga <i>P. nurekis</i> , onde CG é a quantificação de cópias de genes, e UFP é o número de unidades formadoras de placa infecciosas	55
Figura 12 – Inativação de bactérias totais e <i>E. coli</i> em ostras <i>C. gigas</i> com solução aquosa de <i>C. longa</i> e extrato de alga <i>P. nurekis</i> , onde UFC é o número de unidades formadoras de colônias	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Limites para avaliação da qualidade microbiológica de moluscos bivalves e sua água de cultivo	16
Tabela 2 –Casos de gastroenterites associadas à ingestão de ostras <i>C. gigas</i> contaminadas mundialmente	19
Tabela 3 – Análises de antioxidantes e polifenóis em ostras bioacumuladas com solução aquosa de <i>C. longa</i> e extrato de alga <i>P. nurekis</i>	59
Tabela 4 – Análise centesimal das ostras depuradas em água marinha adicionada de solução aquosa de <i>C. longa</i> e extrato de alga <i>P. nurekis</i>	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

CPE: Presença de efeito citopático

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EU SQAP: The European Union Shellfish Quality Assurance Programme

FAO: Food Agricultural Organization

LB: Luria Bertani (meio de cultura)

LCMM: Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos

LVA: Laboratório de Virologia Aplicada UFSC

MEM: Meio Essencial Mínimo (meio de cultura)

MNV-1: Norovírus murino

mL: Mililitro

NoV: Norovirus

ORFs: Open Reading Frames

PBS: Phosphate Buffered Saline (tampão fosfato-salino)

PCR: Reação em Cadeia Polimerase

PEG: Polietilenoglicol

pH: Potencial Hidrogeniônico

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UFP: Unidade Formadora de Placa

uL: Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Produção de ostras <i>Crassostrea gigas</i>	15
1.2 Ostras <i>Crassostrea gigas</i>.....	17
1.3 Vírus entéricos contaminantes da água e alimentos.....	19
1.3.1 Norovírus.....	20
1.4 Modelos virais alternativos aos vírus entéricos: MNV-1 e bacteriófagos.....	23
1.5 Método de controle de patógenos no cultivo de ostras: depuração.....	26
1.7 Produtos naturais	27
2. Hipóteses.....	29
3. Objetivo geral.....	30
4. Objetivos específicos.....	31
5. Delineamento experimental	32
Capítulo I –.....	33
Distribuição tecidual de MNV-1 e ΦX e MS2 usados como alternativas do HNoV, após serem bioacumulados pelas ostras <i>C. gigas</i>.....	33
a) Objetivo específico.....	33
b) Metodologia	33
b.1) Obtenção das ostras.....	34
b.2) Produção e titulação dos controles positivos virais: MNV-1, ΦX e MS2	34
b.3) Bioacumulação das ostras com MNV-1, ΦX e MS2 para avaliação da distribuição viral.....	35
b.4) Quantificação viral nos tecidos das ostras.....	35
b.4.1) MNV-1	35
b.4.2) Bacteriófagos ΦX e MS2	37
c) Resultados e discussão.....	37
c.1) Distribuição tecidual de controles positivos virais usados como alternativas do HNoV, após serem bioacumulados pelas ostras <i>C. gigas</i>.....	37
d) Conclusão.....	41
Capítulo II -.....	42

Desempenho da desinfecção e valoração nutricional de ostras <i>C. gigas</i> mediado pelo processo de depuração associado a produtos de origem natural	42
a) Objetivos específicos	42
b) Metodologia	42
b.1) Produtos naturais	43
b.2) Avaliação virucida dos produtos de origem natural frente ao MNV-1	44
b.3) Sobrevivência das <i>C. gigas</i> em aquários contendo solução aquosa de <i>C. longa</i> e extrato de alga <i>P. nurekis</i>	45
b.4) Redução de MNV-1 mediado por solução aquosa de <i>C. longa</i> em água do mar.....	45
b.5) Ostras bioacumuladas com MNV-1 e submetidas a descontaminação através da solução aquosa de <i>C. longa</i> e extrato de alga <i>P. nurekis</i> em aquários.....	46
b.6) Bioacumulação de <i>E. coli</i> em ostras usando processo de depuração associado a solução aquosa de <i>C. longa</i> e extrato de alga <i>P. nurekis</i>	46
b.7) Análises físico-químicas da água dos aquários	47
b.8) Análise da atividade Antioxidante e Polifenóis totais.....	47
b.8.1) Preparo das amostras	47
b.8.2) Atividade antioxidante	48
b.8.3) Polifenóis totais	48
b.9) Análise centesimal.....	48
b.9.1) Determinação da fração volátil (Umidade) método gravimétrico com uso de calor (105°C) 48	
b.9.2) Determinação da fração de resíduos minerais fixos (Cinzas)	49
b.9.3) Determinação da fração de lipídeos (Gordura) método gravimétrico de Soxlet.....	50
b.9.4) Determinação da fração proteica (Quantificação de Compostos Nitrogenados)	50
b.5) Análises estatísticas.....	51
c) Resultados e discussão.....	52
c.1) Análise da atividade virucida de extrato de alga <i>P. nurekis</i> na inativação do MNV-1	52

c.2) Sobrevivência das ostras <i>C. gigas</i> em aquários contendo solução aquosa de <i>C. longa</i> e extrato de alga <i>P. nurekis</i>	53
c.3) Inativação de MNV-1 em água marinha contendo solução aquosa de <i>C. longa</i>	53
c.4) Inativação de MNV-1 em ostras <i>C. gigas</i> vivas, bioacumuladas com MNV-1 e posteriormente tratadas com solução aquosa de <i>C. longa</i> e extrato de alga <i>P. nurekis</i> em aquários	54
c.5) Inativação de <i>E. coli</i> em ostras usando solução aquosa de <i>C. longa</i> e extrato de alga <i>P. nurekis</i>	57
c.6) Análise de Antioxidantes e Polifenóis.....	58
c.7) Análise centesimal.....	61
c.8) Análises físico-químicas da água marinha	62
d) Conclusão	63
e) Referências	63
9. APÊNDICE 1 – MATERIAIS COMPLEMENTARES	90
9.1 Publicações e participação em eventos	90
9.1.1 Capítulos de livros	90
9.1.2 Resumos publicados em anais de eventos	90
9.1.3 Curso de curta duração ministrado	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produção de ostras *Crassostrea gigas*

A aquicultura é uma importante atividade para geração de alimento e renda, sendo que de acordo com relatórios da *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2020) a produção aquícola cresceu em 5,3% entre 2001 e 2018, compreendendo 17,7 milhões de toneladas de moluscos bivalves (CEDAP, 2020).

Dentre as espécies de moluscos bivalves produzidas, as ostras da espécie *Crassostrea gigas* atingiram um montante de produção de 643.549 toneladas, mundialmente, entre 2001 e 2018 (CEDAP, 2020). No Brasil, Santa Catarina (SC) é considerado o maior produtor nacional de moluscos bivalves, sendo Florianópolis responsável por 98% da produção de *C. gigas* no país (IBGE, 2015).

As ostras são animais que se alimentam através da filtração da água e podem reter patógenos derivados de esgoto, quando cultivadas em águas contaminadas (LEES, 2000). Por essa característica elas podem se tornar veículos para patógenos humanos, ocasionando doenças quando ingeridas cruas ou mal cozidas (ROMALDE *et al.*, 1994; SCHWAB *et al.*, 1998; GUYADER *et al.*, 2006). Geralmente, esses moluscos são produzidos em áreas costeiras muito próximas às atividades humanas, aumentando a chance de contaminação por esgotos sanitários (METCALF, 1995).

No Brasil, União Europeia e Estados Unidos as análises microbiológicas baseiam-se na contagem de coliformes termotolerantes ou *Escherichia coli* na carne de moluscos e na sua água de cultivo (NSSP, 2017; FSA, 2020). Entretanto, não há correlação entre a presença ou ausência desses parâmetros bacterianos com a presença ou não dos patógenos virais humanos (SOUZA *et al.*, 2014). Sendo assim, este tipo de análise não garante a segurança sanitária dos moluscos, pois a resistência e persistência de vírus e bactérias aos tratamentos de esgoto e as condições desfavoráveis são diferentes (GRIFFIN *et al.*, 2003; LOPMAN *et al.*, 2004; MCLEOD *et al.*, 2017). A Tabela 1 apresenta os parâmetros bacterianos para avaliação da qualidade microbiológica de moluscos bivalves e água de cultivo dos mesmos.

Tabela 1. Limites para avaliação da qualidade microbiológica de moluscos bivalves e sua água de cultivo.

Legislação	Amostra analisada	Parâmetro bacteriano	Retirada de moluscos bivalves	Pós-tratamento requerido
Brasil CONAMA 357/2005 MPA Portaria 204/2012	Água (100mL)	Médias geométricas $\leq 43/100\text{ml}$. ≥ 15 amostras do mesmo local. Com percentil 90 ≤ 88 de <i>E. coli</i>	Permitida	Nenhum
	Molusco bivalve (100 g da parte comestível) 80º percentil de amostras	< 230 MPN de <i>E. coli</i>	Aprovada	Não requer pós-tratamento
		$\geq 230 - \leq 46.000$ MPN de <i>E. coli</i>	Aprovada Condicionalmente	Depuração, ou retransmissão, ou tratamento térmico
		> 46.000 MPN de <i>E. coli</i>	Suspenso	Colheita não permitida
União Europeia EU SQAP 854/2004 e 853/2004	Molusco bivalve (100 g da parte comestível) 80º percentil de amostras	< 230 MPN de <i>E. coli</i>	Classe A	Não requer pós-tratamento
		< 4.600 MPN de <i>E. coli</i>	Classe B	Tratado termicamente ou purificado
		46.000 MPN de <i>E. coli</i>	Classe C	Depurado por dois meses
Estados Unidos NSSP, 2017	Água (100ml)	Geométrico significa < 70 do Total de Coliformes < 14 MPN ou MF de <i>E. coli</i>	Aprovado	Não requer pós-tratamento
		Total de Coliformes < 700 < 88 MPN ou MF de <i>E. coli</i>	Restrita	Depuração ou retransmissão em uma área aprovada
		Coliformes totais > 700 < 88 MPN ou MF de <i>E. coli</i>	Proibida	Colheita não permitida

*5 amostras com 100g de carne (cada) coletadas em diferentes pontos da fazenda de moluscos no mesmo dia.
MPN=Número Mais Provável; MF=Filtro de Membrana.

Considerando os parâmetros bacterianos avaliados, ressalta-se que a *E. coli* é uma bactéria de elevada importância visto que pode causar infecções graves em animais e humanos. Sua transmissão pode ocorrer por diversas vias, como: contato direto, contato com excreções de animais ou via cadeia alimentar (POIREL *et al.*, 2018).

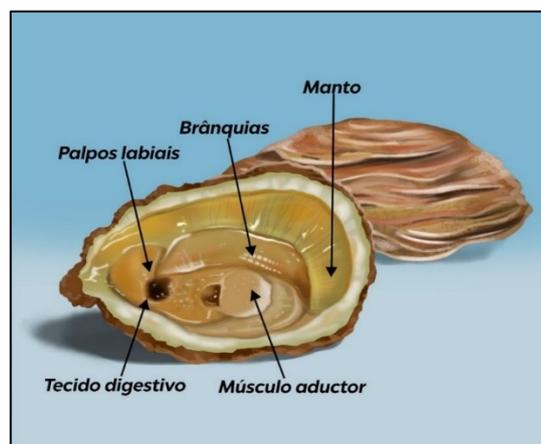
A *E. coli* pode representar também um considerável reservatório de genes de resistência prejudicando e causando falhas de tratamento na medicina veterinária e humana (POIREL *et al.*, 2018). Possui genoma composto por um cromossomo circular e plasmídeos.

Ele varia de 4,2 à 6,0 Mbp, correspondendo a 3.900-5.800 genes (TOUCHON *et al.*, 2009; LUKJANCENKO, 2010; TOUCHON *et al.*, 2020). A sua variabilidade é resultado de aquisições e deleções frequentes de fragmentos de DNA durante a divergência de *E. coli* (BERGTHORSSON *et al.*, 1998; TOUCHON *et al.*, 2020). E sua resistência quanto aos antibióticos está crescente (CASSINI *et al.*, 2019) e agora ocupa o terceiro lugar na lista dos doze “patógenos prioritários” resistentes a antibióticos descritos pela OMS (Organização Mundial da Saúde). Ela é muito utilizada como indicador de contaminação fecal e a sua presença no meio aquático é frequente. Sendo muito resistente em áreas ambientais, podendo chegar ao homem através de ingestão de ostras *in natura*, e em conjunto conferir resistência a cepas *E. coli* comensais do trato intestinal (YANG *et al.*, 2012).

1.2 Ostras *Crassostrea gigas*

As ostras *C. gigas* pertencem ao filo Mollusca, classe Bivalvia, família *Ostreidae*. São desprovidas de esqueleto, sendo composta por um corpo mole protegido por duas conchas calcárias, unidas por um ligamento córneo (RUPPERT; BARNES, 1996). Seu corpo é formado por: conchas, músculo adutor, brânquias, manto, sistema digestivo, sistema circulatório e sistema nervoso (NETO, 2011). Suas brânquias, coração, fígado, boca, estômago, intestino, ânus, pálpebras, músculo adutor, tentáculos e gânglio cerebral ficam na massa visceral, cobertos pelo manto. Possui brânquias bem desenvolvidas que são responsáveis pela sua respiração e também filtração dos alimentos (CORRÊA, 2010). Estes alimentos são adquiridos através de matéria orgânica e inorgânica, fitoplâncton e partículas suspensas na água (SOARES, 2013). A figura 1 apresenta as principais estruturas anatômicas de uma ostra *C. gigas*.

Figura 1. Principais estruturas anatômicas da *Crassostrea gigas*.



Consideradas iguarias muito apreciadas na gastronomia mundial, são ricas em ácidos graxos, ômega 3, ômega 6 e zinco, elementos fundamentais na proteção contra doenças cardiovasculares (LIGHAM *et al.*, 2016). Assim o consumo de ostras colabora para uma dieta saudável com baixo teor de colesterol (PARISENTI *et al.*, 2010).

A qualidade nutricional da carne da ostra depende de sua composição química, que apresenta uma variação sazonal. Sendo capaz de variar de uma espécie para outra ou até mesmo dentro da mesma espécie, podendo ser afetada por alguns fatores como: época do ano, local e temperatura da água de cultivo, idade, tamanho, sexo, tipo de processamento e estocagem do produto (PEDROSA; COZZOLINO, 2001; ORBAN *et al.*, 2004; PORTELLA, 2005).

Apesar de sua popularidade como iguaria, o consumo de ostras em especial cruas é comumente associado a surtos de gastroenterites virais em todo o mundo, com casos de diferentes proporções ocorrendo com diferentes agentes virais (COSTANTINI *et al.*, 2006; GUYADER *et al.*, 2006; GUILLOIS -BÉCEL *et al.*, 2009). Um exemplo desses surtos, foi o que ocorreu na França, em janeiro de 2012, autoridades de saúde francesas foram notificadas sobre um surto de gastroenterite aguda por norovírus envolvendo 30 residentes e funcionários num lar de idosos. Um almoço festivo foi servido na instalação em 4 de janeiro de 2012, durante o qual foram servidas ostras cruas (LOURY *et al.* 2015). No Brasil, são poucos os estudos e relatórios epidemiológicos que discriminam a ocorrência de gastroenterite por agente etiológico, dificultando estabelecer um perfil epidemiológico somente por norovírus e ainda relacionado ao consumo em específico de ostras (FLORÊNCIO *et al.* 2021). A Tabela 2 apresenta uma série de casos de gastroenterites virais ocorridos em todo o mundo que têm sido associados à ingestão de ostras *C. gigas* contaminadas.

Tabela 2. Casos de gastroenterites associadas à ingestão de ostras *C. gigas* contaminadas, mundialmente entre os anos de 1961 até 2018.

Data	País	Pessoas infectadas	Vírus detectado	Referências
Janeiro - Março (1961)	Estados Unidos	80	Hepatite A	MASON e MCLEAN (1962)
Junho (1978)	Austrália	2000	Norovírus	MURPHY <i>et al.</i> (1979)
Outubro (1988)	Itália	47	Hepatite A	STROFFOLINI <i>et al.</i> (1990)
Agosto (1996)	Austrália	92	Norovírus	STAFFORD <i>et al.</i> (1997)
Fevereiro (2004)	Reino Unido	15	Norovírus	GALLIMORE <i>et al.</i> (2005)
Agosto (2007)	França	111	Hepatite A	GUILLOIS-BÉCEL <i>et al.</i> (2009)
Janeiro (2010)	Reino Unido, Noruega, França, Suécia e Dinamarca	334	Norovírus	WESTRELL <i>et al.</i> (2010)
Mai (2013)	Coreia do Sul	8	Norovírus	CHO <i>et al.</i> (2016)
Março (2018)	Espanha	11	Norovírus	PARRÓN <i>et al.</i> (2019)

1.3 Vírus entéricos contaminantes da água e alimentos

Os vírus entéricos são frequentemente detectados em amostras ambientais (águas, esgoto e alimentos) (BOSCH *et al.*, 2010; RODRÍGUEZ-LÁZARO *et al.*, 2012). São muito resistentes a diversos estresses ambientais (incluindo variações de temperatura e pH; desinfetantes; salinidade; e irradiação UV), e por terem baixas doses infectantes, estão associados a diversas doenças transmitidas pela água e alimentos como: moluscos bivalves, peixes, frutas e vegetais (FUMIAN *et al.*, 2009; BOSCH *et al.*, 2010). Estão presentes no trato gastrointestinal humano (DE MORAES TAVARES *et al.*, 2005). São excretados em grande quantidade nas fezes de pessoas infectadas, com concentrações de 10^5 a 10^{13} partículas virais por gramas de fezes (BOSCH *et al.*, 2008).

Podem causar diversas infecções como: gastroenterite, conjuntivite, infecções no trato respiratório, hepatite, meningite, miocardite e paralisia. Dentre estes agentes virais, destacam-se: Norovirus, Enterovírus, Hepatite A, Hepatite E, Rotavírus e Adenovírus (OMS, 2017). Os

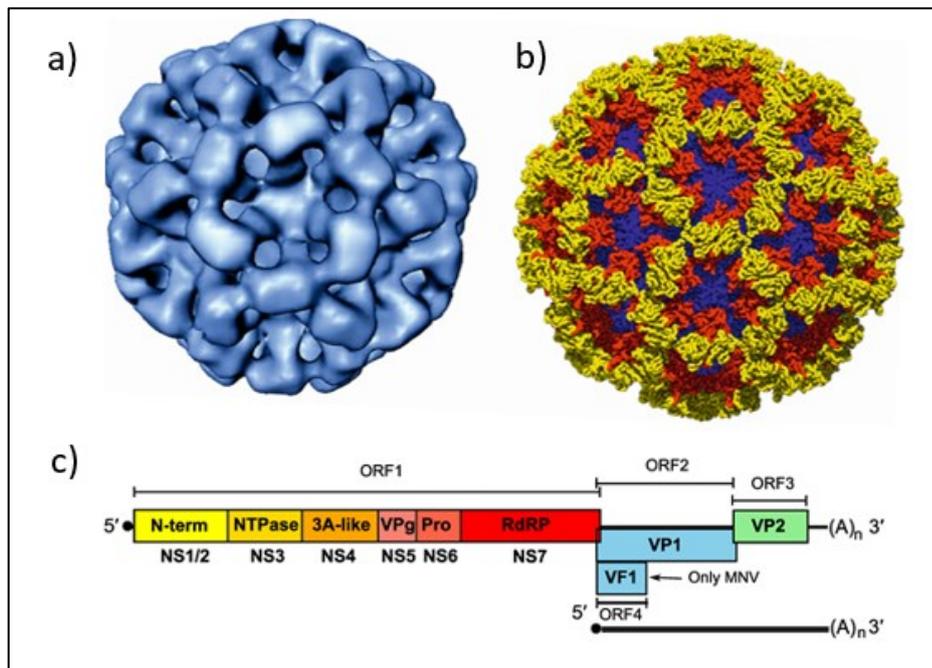
norovírus são os mais frequentemente encontrados nos moluscos por causa de sua alta prevalência (FERREIRA *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2017; REYMÃO *et al.*, 2018).

1.3.1 Norovírus

Os norovírus (NoV) pertencem à família *Caliciviridae*, trata-se de um vírus não envelopado, de origem RNA, com fita simples e sentido positivo, com aproximadamente 7,5 Kb (CHHABRA *et al.*, 2019). Estão distribuídos em dez genogrupos recentemente classificados como GI, GII, GIII, GIV, GV, GVI, GVII, GVIII, GIX e GX. Sua classificação é baseada nas sequências completas de aminoácidos do capsídeo. Dentre estes genogrupos, cinco causam doenças em humanos, GI, GII, GIV, GVIII e GIX (CHHABRA *et al.*, 2019). O genogrupo II é o mais prevalente em surtos de doenças associadas à contaminação de água e alimentos. E o genogrupo GI é o mais detectado nos casos de gastroenterites virais após consumo de moluscos bivalves (GUYADER *et al.*, 2012).

Seu genoma é organizado em três fases de leitura aberta ou ORFs (*open Reading frames*): ORF1, é responsável por codificar uma poliproteína para seis proteínas não estruturais; ORF2 codifica a proteína estrutural principal (VP1), que contém os domínios shell (S) e salientes (P). O subdomínio P2 é variável, com epítomos neutralizantes e regiões de interação com antígenos de grupos histo-sanguíneo (HBGAs); e a ORF3, que codifica uma proteína estrutural menor (VP2) (CHHABRA *et al.*, 2019). A figura 2 apresenta a estrutura do capsídeo do NoV, estrutura dos domínios e organização das três ORFs.

Figura 2. a) Estrutura do capsídeo de NoV, b) Estrutura dos domínios *Shell*, *Protruding 1* e *Protruding 2*, c) Organização das três fases de leitura aberta ou ORFs: ORF1, ORF2 e ORF3.



Fonte: Adaptado de PRASAD *et al.* (1999) e MCFADDEN *et al.* (2011).

São conhecidos mundialmente como os principais agentes causadores de gastroenterite aguda, atingindo pessoas de todas as idades, sendo responsáveis por cerca de 18% de todos os casos de gastroenterite aguda no mundo. Chegando a causar cerca de 685 milhões de casos de gastroenterite aguda e mais de 210.000 mortes por ano (ZHANG *et al.*, 2020). Podem estar presentes em grandes quantidades no esgoto (TEUNIS *et al.*, 2014). São altamente resistentes e geralmente detectados em efluentes de estações de tratamento de água e esgoto (YANG *et al.*, 2012; CAMPOS *et al.*, 2014).

O pouco que se sabe sobre a patogenia dos NoV, é através de pesquisas realizadas com voluntários humanos infectados ou utilizando Norovírus murino tipo 1 (MNV-1) e outros calicivírus. Em estudo realizado em voluntários foi demonstrado que o NoV entra no organismo principalmente por via oral e apresenta um período de incubação de 10 a 51 h, com média de 24 h. Geralmente, a duração da doença é aguda sendo de 24 a 48 h. Resultados de biópsias intestinais em voluntários que manifestaram a doença, mostraram que a mucosa intestinal destes apresentou anormalidades, tais como achatamento e alargamento das vilosidades intestinais, hiperplasia das células criptas, vacuolização citoplasmática e infiltração de células polimorfo e mononucleares na lâmina própria, porém a mucosa propriamente dita se mantinha intacta. Não

foi observada nenhuma alteração histológica no fundo e no antro gástricos e mucosa do cólon, na fase aguda ou de recuperação da doença. A atividade enzimática intestinal sofre diminuição também, resultando em uma má absorção de carboidratos transitória e esteatorreia branda. O esvaziamento gástrico é atrasado e a redução da motilidade gástrica pode ser responsável pelas náuseas e vômitos associados à gastroenterite. Ainda não se sabe o porquê esta doença é tão rápida e frequentemente explosiva (SANTOS *et al.*, 2015).

Os surtos causados pelos NoV podem ser ocasionados por diversas vias de transmissão: de pessoa para pessoa que pode ser por via fecal-oral e por aerossóis gerados durante episódios de jatos de vômito, que ocorrem durante a doença e pela ingestão de água e alimentos contaminados. Devido à grande diversidade do NoV, repetidas infecções podem ocorrer durante a vida de um indivíduo. O NoV causa uma doença moderada, porém de maneira eventual é descrita como uma doença grave, precisando de intervenção médica em alguns casos. Os sintomas mais observados durante os surtos associados aos NoV são: náusea, vômito, diarreia, dor abdominal, podendo ocorrer também dor de cabeça e febre (SANTOS *et al.*, 2015).

Os NoVs são resistentes aos estresses ambientais, como uso de desinfetantes em concentrações normalmente usadas em estações de tratamento de água, persistindo estáveis na água por até cinquenta dias (NGAZOA *et al.*, 2008; COOK *et al.*, 2016). E também pode permanecer nos órgãos das ostras por meses (NAPPIER *et al.*, 2010). Esta característica de permanecer nas ostras se explica pela capacidade de ligação com ligantes presentes nas células da glândula digestiva desses animais (GUYADER *et al.*, 2012). Estes se assemelham aos presentes nas células humanas (HBGA, ou antígenos de grupos sanguíneos humanos) e que são utilizados pelos NoV durante o processo de infecção nos humanos. Por esse motivo, esses ligantes presentes nas ostras foram denominados HBGA-like (MARIONNEAU *et al.*, 2002; LINDESMITH *et al.*, 2003; HUTSON *et al.*, 2004). Estudos demonstrando a capacidade de ligação dos genogrupos I e II ao HBGA-like foram publicados. Eles também correlacionam a capacidade desses genogrupos permanecerem por mais tempo dentro das ostras à presença do HBGA-like. (GUYADER *et al.*, 2006; TIAN *et al.*, 2007). Em testes de bioacumulação envolvendo diferentes genogrupos de NoV por *C. gigas*, Zakhour *et al.* (2010), observaram que os genogrupos humanos (I e II) foram muito mais bioacumulados pelas ostras do que o bovino (III). Atribuíram a diferença nos resultados à incapacidade do GIII de se ligar ao HBGA-like. Sabe-se que o GIII utiliza o epítipo alfa-galactosidase (α -Gal) para iniciar a infecção nos bovinos e que estrutura semelhante a essa não foi encontrada nas células das ostras (MESQUITA *et al.*, 2011; LOWTHER *et al.*, 2012; FUSCO *et al.*, 2017).

Atualmente, a detecção de NoV é baseada em técnicas moleculares, como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e PCR quantitativa ou em tempo real (qPCR), pois tratam-se de métodos rápidos e práticos para a detecção de NoV nas glândulas digestivas de ostras (ATMAR e ESTES 2001; KINGSLEY e RICHARDS 2001; KOU *et al.* 2008). A desvantagem é que suas eficiências são diminuídas pela presença de inibidores que interferem nesses ensaios e também pelo fato de não poderem diferenciar entre os vírus viáveis (infecciosos) ou não nas amostras (SCHULTZ *et al.*, 2007; JONES *et al.*, 2014; KATAYAMA *et al.*, 2014). Por esse motivo, com o aumento das infecções causadas pelos NoV e outros vírus entéricos, os estudos sobre o uso de vírus alternativos para a detecção de NoV apresentaram aumento (KARST *et al.*, 2014).

1.4 Modelos virais alternativos aos vírus entéricos: MNV-1 e bacteriófagos

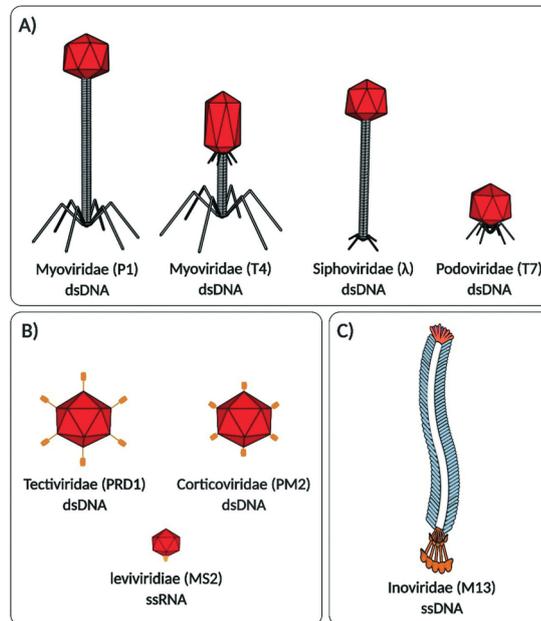
Os HNoV são fastidiosos e embora existam protocolos publicados recentemente para a avaliação da infecciosidade desses vírus através de técnicas baseadas em cultivo celular, ainda são pouco eficientes quando voltados às avaliações a partir das amostras ambientais, como água e alimentos (JONES *et al.*, 2015). Neste sentido, o MNV-1 é utilizado como modelo alternativo aos HNoV em diversos testes laboratoriais, inclusive os de inativação viral e depuração de moluscos bivalves (BAERT *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2014; PILOTTO *et al.*, 2015). O MNV-1 pertence ao genogrupo V do gênero *Norovirus* e possui semelhanças bioquímicas e genéticas de cerca de 98% quando comparado aos HNoV. Também é resistente ao calor e a acidez (63°C e pH 2,7), resistente aos desinfetantes convencionais, sendo muito estável e persistente nos ambientes aquáticos, como águas recreacionais e de consumo. Quando utilizado na contaminação de diversos tipos de alimentos tais como: frutas, vegetais e ostras, pode permanecer infeccioso, ou viável, por até 50 dias (CANNON *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2012). Ainda, o MNV-1 é adaptado ao cultivo *in vitro*, com a utilização de macrófagos murinos da linhagem celular RAW 264.7, permissivos à infecção por estes vírus. Por essa razão, é possível realizar ensaios de estabilidade e quantificação viral com formação típica de formações de placa de lise (BAE e SCHWAB, 2008). Esse vírus tem sido utilizado em diversos estudos envolvendo moluscos bivalves, para estimar a eficiência de recuperação viral em algumas etapas do processamento de amostras (GIRARD *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2018), na avaliação do acúmulo viral nos tecidos e órgãos, estabilidade viral (durante o cozimento, pós-tratamento por irradiação UV e outros) (CROCI *et al.*, 2005; NAPPIER *et al.*, 2008; BAE; SCHWAB, 2008; PILOTTO *et al.*, 2019; SOLIS-SANCHEZ *et al.*, 2020) e depuração (PROVOST *et al.*, 2011).

Souza *et al.*, (2013), utilizaram o MNV-1 como controle viral na depuração de ostras em estudo de cinética de descontaminação microbiológica por radiação ultravioleta (UV) em pontos de venda de ostras vivas no município de Florianópolis-SC-Brasil, para escolher o melhor protocolo de depuração para descontaminação viral das ostras. Pilotto (2015), utilizou o MNV-1 na avaliação da bioacumulação viral pelas ostras e observou que houve aumento na concentração dele nos tecidos digestivos das ostras ao longo do tempo, quando esses animais permaneceram em água contaminada por esse vírus.

Outra alternativa de modelo viral são os bacteriófagos, descobertos entre 1915 e 1917 e descritos em 1926 por D’Herelle como “vírus capazes de parasitar bactérias”. Os bacteriófagos também têm sido usados como indicadores de contaminação por vírus entéricos em estudos de estabilidade viral, bem como indicadores de qualidade viral em ambientes. Isso deve-se ao fato deles estarem amplamente distribuídos em ambientes aquáticos e em alimentos. Também por compartilharem características morfofisiológicas semelhantes aos vírus entéricos de mamíferos, tais como: tamanho, forma, morfologia, eletrostática, arquitetura viral e composição química de superfície (JOFRE *et al.*, 1986; IAWPRC, 1991; HAVELAAR *et al.*, 1993; DURÁN *et al.*, 2002; PEDROSO *et al.*, 2003; GRABOW, 2004; REYNOLDS, 2006; LECHEVALLIER *et al.*, 2006; TUFENKJI; EMELKO, 2011; PAZ-Y-MIÑO, 2013). Apresentam ainda sistema de replicação *in vitro* simplificado, de baixo custo e biologicamente seguros pois não são patogênicos aos humanos. Além disso, são facilmente encontrados e isolados em fezes e ambientes aquáticos, em geral numa densidade de 10^4 a 10^8 UFP/mL (WITHEY *et al.*, 2005).

O sufixo “fago” relaciona-se ao seu “desenvolvimento às custas de”, pois seu metabolismo depende de um organismo procarionte (D’HERELLE, 1926; DELBRÜCK, 1942; LURIA, 1950). Estima-se que existam cerca de um nonilhão de espécies de bacteriófagos distribuídos nos mais diversos tipos de ambientes. Atuam como componentes ativos dos ecossistemas, sendo as entidades biológicas mais abundantes do globo terrestre (FUHRMAN, 1999; BALTER 2000; ROHWER, 2003; CLOKIE, 2011). A Figura 3 apresenta a classificação dos fagos de acordo com sua morfologia e material genético.

Figura 3. Fagos classificados com base na morfologia e material genético (DNA de fita dupla: dsDNA, RNA de fita simples: ssRNA e DNA de fita simples: ssDNA). (A) fagos com cauda, (B) fago icosaédrico, (C) fago filamentososo.



Fonte: BAYAT et al., (2021).

Dentre os fagos utilizados no monitoramento ambiental, os bacteriófagos MS2 são os mais frequentes devido sua propagação fácil e detecção em modelos virais. Ele tem um capsídeo icosaédrico, pertence à família *Leviviridae* e tem semelhanças com o NoV tais como: tamanho (26 nm de diâmetro), RNA de fita simples com sentido positivo, capacidade de persistir no intestino e resistência a vários tratamentos de desinfecção (CALENDER *et al.*, 1998; DAWSON *et al.*, 2005; SHIM *et al.*, 2017; DANG e TARABARA, 2019). Seu hospedeiro bacteriano é a *E. coli*, geralmente é encontrado com frequência nos esgotos e nas fezes de animais (MAILLARD *et al.* 1994; SHIN e SOBSEY 2003).

Um outro exemplo de bacteriófago utilizado como modelo indicador de contaminação pelos vírus entéricos, é o PhiX (Φ X). Possui genoma composto por DNA, fita simples (ssDNA) e infecta *E. coli* (LABRIE *et al.*, 2014). Além de estar presente nos efluentes de esgoto, também é de fácil propagação na bactéria hospedeira e através de técnicas menos onerosas do que as utilizadas para os vírus entéricos (BURKHARDT *et al.*, 1992; DORÉ *et al.*, 2000; MCMINN *et al.*, 2017).

Nesse sentido, MNV-1 e bacteriófagos são ferramentas importantes como modelos virais utilizados para mensurar a contaminação e descontaminação dos moluscos bivalves,

sendo também utilizados em experimentos que avaliam bioacumulação e taxas de decaimento, de inativação viral por agentes físicos ou químicos, de estabilidade viral e para fins de análise quantitativa de risco microbiológico (SOUZA *et al.*, 2018; PILOTTO *et al.*, 2019).

1.5 Método de controle de patógenos no cultivo de ostras: depuração

A depuração utiliza a capacidade natural dos moluscos bivalves de se limparem enquanto filtram a água para obter seus alimentos. Este processo pode ocorrer em ambientes naturais (mar, rios, etc), denominado de relocação (*relaying*), ou em tanques de depuração. A depuração em tanques foi inicialmente desenvolvida para reduzir os patógenos bacterianos humanos presentes na carne dos moluscos bivalves. Nos tanques, os animais permanecem por períodos de 24 a 48 h, para que possam ser descontaminados (LEE *et al.*, 2008; MCLEOD *et al.*, 2017). Esses sistemas de depuração podem ser abertos, semiabertos ou fechados (com recirculação de água), de acordo com a vazão da água no tanque. Em alguns casos, para garantir a qualidade sanitária da água do tanque, são aplicados processos físicos ou químicos na descontaminação da água (LEES *et al.*, 2010). Os processos mais utilizados são o ozônio e ultravioleta (UV), a cloração tem sido abandonada por ocasionar alterações organolépticas no produto (carne dos animais). Apesar de alguns estudos apontarem outros processos para a redução da contaminação viral em moluscos bivalves, inclusive baseados em compostos naturais, alguns deles precisam de mais estudos para atuarem em escala real, em tanques de depuração (LEES *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2015).

Compostos naturais são promissores no processo de desinfecção de alimentos. Alguns deles possuem atividade antimicrobiana sem qualquer efeito prejudicial à saúde humana (SU *et al.*, 2010). Estudos apresentaram que o uso de curcumina em humanos demonstrou um comportamento seguro, mesmo diante de doses altas não demonstrando efeitos tóxicos (VAUGHN; BRANUM; SIVAMANI, 2016). Soleimani *et al.*, 2018, comprovou que a quantidade de 200 mg/dia de curcumina não apresentou toxicidade quando utilizada por jovens saudáveis por via oral durante 8 semanas. Já a utilização de microalgas como produtos alimentares tem tido um aumento, isso graças aos seus benefícios para a saúde. Nesse sentido, de acordo com a Administração Americana de Alimentos e Medicamentos (FDA) e a autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) esses produtos são geralmente reconhecidos como seguro (VAZ *et al.*, 2016; MARTELLI *et al.*, 2014). Wu *et al.* (2015), utilizaram ação fotodinâmica mediada pela curcumina, com comprimento de onda de 470 nm, densidade de

energia de 3,6 J/cm² e concentração de 10 µM de curcumina. Demonstraram que o MNV-1 decaiu de 1-3 log UFP/mL nos tecidos das ostras. No entanto, ainda não há dados na literatura reportando a descontaminação viral das ostras vivas através do uso da curcumina. Para que sejam utilizadas *in vivo* nas ostras (em aquários/tanques), compostos naturais como a curcumina não poderiam produzir estresses nesses animais, além de não alterarem suas características organolépticas.

1.7 Produtos naturais

Diversas pesquisas estão sendo conduzidas com extratos naturais, com o interesse na descoberta do potencial terapêutico das substâncias presentes, pois muitas demonstraram ser promissoras na inativação de patógenos e assim no controle e propagação de doenças (NOLKEMPER *et al.*, 2006; KEIVAN *et al.*, 2007; BAKKALI *et al.*, 2008).

A curcumina é um composto fenólico obtido da *Curcuma longa*, conhecida no Brasil como açafrão da terra, da família Zingiberaceae (AGGARWAL *et al.*, 2007; RAVINDRAN *et al.*, 2007). Possui propriedades biológicas de interesse para aplicação em alimentos, como atividade anti-inflamatória, antioxidante, antifúngica e antimicrobiana (AKPOLAT *et al.*, 2010; WU *et al.* 2015).

Sua composição química pode ser influenciada por vários fatores como: cultivo, tipo de plantio, solo, disponibilidade hídrica, época de colheita e clima. A composição química pode variar entre 30 a 50% de amido, 6 a 10% de proteína, 6,5 a 8,5 % de cinzas, 2 a 6% de fibras, 3 a 6 % de óleo volátil e 2 a 8% de curcuminóides (GOVINDARAJAN; STAHL, 1980; BRAGA *et al.*, 2003). Os curcuminóides são polifenóis e conferem coloração amarela para os rizomas. São divididos em três principais substâncias: a curcumina 80%, a desmetoxicurcumina 18% e a bisdesmetoxicurcumina 2% (ANAND *et al.*, 2008; GOEL; AGGARWAL, 2010). Estes compostos apresentam diversas finalidades sendo utilizados como corante, condimento e aplicação na medicina tradicional para tratamento de doenças bacterianas e de origem gastroentérica (NAIR, 2013). Na indústria de alimentos essa planta é utilizada como um corante natural para substituir os corantes sintéticos (OSORIO-TOBÓN *et al.*, 2014).

Outro composto natural que tem chamado a atenção são as microalgas de água doce e marinha. Estas, são ricas em vitaminas, proteínas com aminoácidos essenciais, ácidos graxos, polissacarídeos, minerais, enzimas, fibras e pigmentos fotossintéticos como clorofilas e

carotenoides (MONTALVÃO *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2018). Um exemplo é a microalga verde *Planktochlorella nurekis* (SKALOUD *et al.* 2014).

Graças aos compostos bioativos das algas, estas estão despertando crescente interesse por suas propriedades antitumorais, antivirais, anticoagulantes e antioxidantes (WANG *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2018; BESEDNOVA *et al.*, 2021). Ainda, apresentam baixa citotoxicidade, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (BESEDNOVA *et al.*, 2021). Também, encontram-se muitos estudos *in vitro* comprovando os efeitos antivirais dos seus produtos, porém poucos estudos avaliam a eficiência deles *in vivo* e no meio ambiente (ROSA *et al.*, 2019).

Com base no exposto, a utilização de *C. longa* e *P. nurekis* com propriedades antivirais, antimicrobianas e antioxidantes em tanques de depuração de ostras pode trazer benefícios a estes moluscos, como: redução viral e bacteriana, aumento na composição de antioxidantes e polifenóis, e agregar valor nutricional. No entanto, entender os mecanismos de ação antimicrobiana de extratos dessas plantas é o primeiro passo para se descobrir sua utilização ideal como agentes antimicrobianos naturais mantendo a qualidade desse alimento (GONELIMALI *et al.*, 2018).

2. Hipóteses

Hipótese 1: MNV-1 e bacteriófagos Φ X e MS2 apresentam dinâmica de distribuição tecidual semelhantes à dos HNoV em ostras *Crassostrea gigas* após processo de bioacumulação viral.

Hipótese 2: MNV-1 e *Escherichia coli* são inativados em processo de depuração de ostras *Crassostrea gigas* associado aos produtos naturais de *Curcuma longa* e *Planktochlorella nurekis*.

Hipótese 3: O processo de depuração em tanque associado a produtos naturais de *Curcuma longa* e *Planktochlorella nurekis* promove sanitização e valorização nutricional de ostras *Crassostrea gigas*.

3. Objetivo geral

Avaliar o padrão de distribuição de contaminantes virais (MNV-1 e bacteriófagos) nos órgãos de ostras *Crassostrea gigas*, durante o processo alimentar por filtração da água, assim como o desempenho de produtos naturais incorporados à depuração, quanto à capacidade destes na desinfecção e na valoração nutricional.

4. Objetivos específicos

- a) Quantificar a distribuição tecidual de MNV-1 e de ΦX e MS2 em manto, brânquias e tecido digestivo de ostras *Crassostrea gigas*, durante o processo de alimentação por filtração da água;
- b) Inferir o decaimento de MNV-1 e *Escherichia coli* em ostras *Crassostrea gigas* durante depuração em aquários com água marinha adicionada de solução aquosa de *Curcuma longa* e extrato de alga *Planktochlorella nurekis*;
- c) Avaliar o potencial antioxidante e concentração de polifenóis das ostras *Crassostrea gigas* que permaneceram em águas contendo solução aquosa de *Curcuma longa* e extrato de alga *Planktochlorella nurekis*;
- d) Determinar a composição centesimal dos tecidos de ostras *Crassostrea gigas* após o processo de purificação com a utilização da solução aquosa de *Curcuma longa* ou extrato de alga *Planktochlorella nurekis*.

5. Delineamento experimental

Este projeto foi dividido em dois capítulos:

- (I) Distribuição tecidual de MNV-1 e Φ X e MS2 usados como substitutos dos vírus entéricos, após serem bioacumulados pelas ostras *C. gigas*.
- (II) Utilização de solução aquosa de *C. longa* e extrato de *P. nurekis* na inativação de MNV-1 e *E. coli* bioacumulados por ostras.

Capítulo I –

Distribuição tecidual de MNV-1 e Φ X e MS2 usados como alternativas do HNoV, após serem bioacumulados pelas ostras *C. gigas*

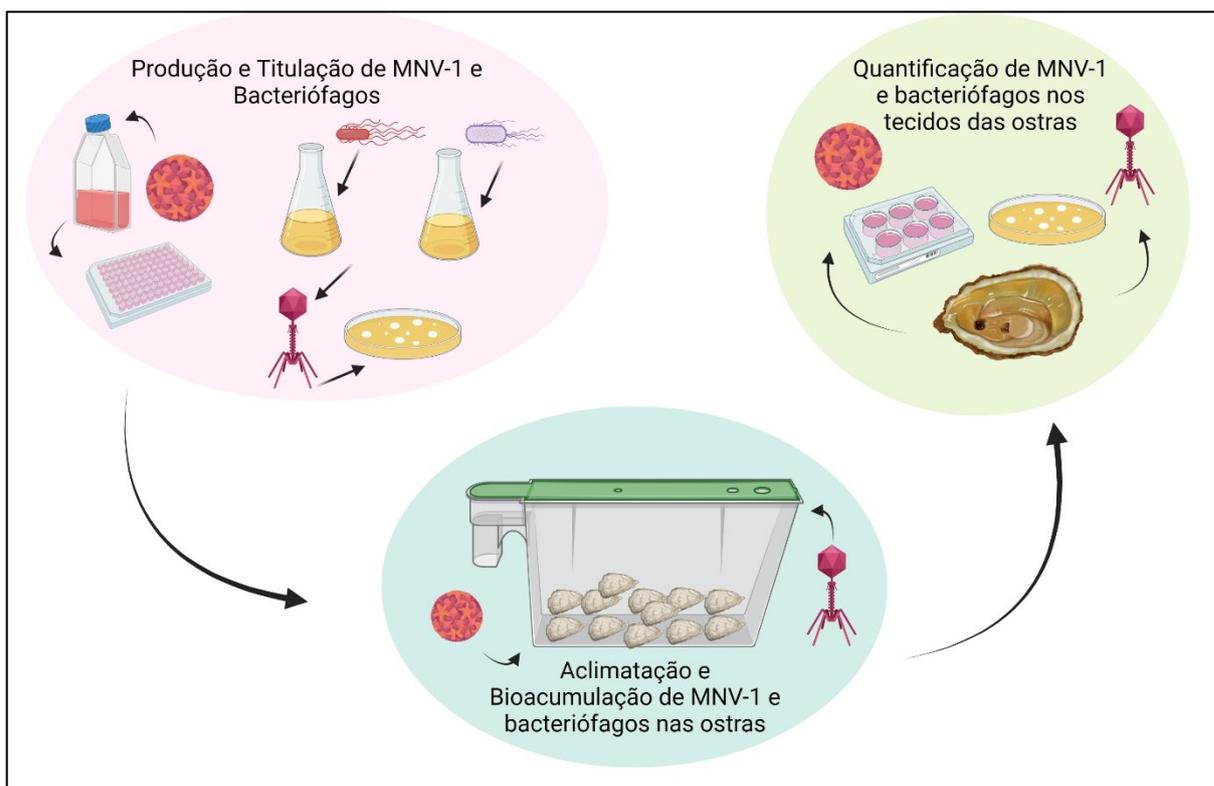
a) Objetivo específico

- a) Quantificar a distribuição tecidual de MNV-1 e de Φ X e MS2 em manto, brânquias e tecido digestivo de ostras *Crassostrea gigas*, durante o processo de alimentação por filtração da água;

b) Metodologia

A Figura 4 resume o desenho experimental do presente capítulo.

Figura 4: Resumo gráfico da metodologia, apresentando a produção viral, seguido de bioacumulação viral e análises de tecidos provenientes de ostras vivas.



b.1) Obtenção das ostras

As ostras *C. gigas* utilizadas em todos os experimentos desta pesquisa foram fornecidas pelo Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (LCMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Foram transportadas vivas ao Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) e postas em aclimatação às condições laboratoriais por 12 h. Os aquários para aclimatação possuíam água marinha natural, com aeração constante e permaneceram em sala climatizada durante todo o processo.

b.2) Produção e titulação dos controles positivos virais: MNV-1, Φ X e MS2

O MNV-1 foi produzido em células RAW 264.7 (ATCC TIB-71TM) (Linhagem celular de macrófagos que foi estabelecida a partir de um tumor em um camundongo macho induzido com o vírus da leucemia murina Abelson) e titulada por placa de lise seguindo protocolos publicados por BAE e SCHWAB (2008). Ambas as células e o MNV-1 foram gentilmente doados pela Dra. Rosina Gironès da Universidade de Barcelona, Espanha.

Para a produção de fagos, uma alíquota de 1 mL de Φ X e uma alíquota de 1 mL de MS2 foram inoculadas em dois Erlenmeyer, cada um contendo 25 ml de caldo Luria Bertani (LB) e 1 mL de bactéria hospedeira *E. coli* (ATCC 13706) e *Salmonella* (ATCC 14028), respectivamente, cultivadas por 3 h até atingir uma densidade óptica entre 0,3-0,5. Após a inoculação, a suspensão de fagos e bactérias foi incubada por 16 h a 37°C.

Após a incubação, as suspensões foram transferidas para tubos tipo falcon, centrifugadas por 20 min a 3000 rpm. O sobrenadante foi coletado e o pellet formado no fundo do tubo foi descartado. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado através de um filtro de 0,22 μ M (Millipore).

A titulação dos fagos foi realizada pela técnica de duplo ágar (ADAMS, 1959). Para titulação do fago Φ X, 1 mL da suspensão foi diluído na base 10 em água destilada. Um mililitro de cada diluição foi misturado com 1 mL de suspensão bacteriana *E. coli* (ATCC 13706) com densidade óptica = 0,3 - 0,5 mais 1 mL de ágar semi-sólido (Kasvi), seguido de vórtex e vertido em uma placa de Petri previamente preparada com LB ágar (Kasvi). Para titulação do fago MS2, 1 mL da suspensão foi diluído na base 10 em água destilada. 1 mL de cada diluição foi misturado com 1 mL de suspensão bacteriana *Salmonella* (ATCC 14028) com densidade óptica

= 0,3 - 0,5 mais 1 mL de ágar semi-sólido, seguido de vórtex e vertido em placa de Petri previamente preparada com LB ágar.

b.3) Bioacumulação das ostras com MNV-1, ΦX e MS2 para avaliação da distribuição viral

Três experimentos em diferentes semanas foram realizados para observar a distribuição dos controles positivos virais (MNV-1, ΦX e MS2) nos tecidos das ostras.

Para as bioacumulações com MNV-1, em cada experimento, 36 foram colocadas em um aquário contendo 10 L de água do mar natural e 7×10^8 UFP de MNV-1. Três ostras/amostras foram coletadas de cada aquário nos tempos 0, 4, 6 e 24 h após a adição dos vírus, foram dissecados os tecidos digestivos (TD), as brânquias (BR) e os mantos (MT) para que fossem homogeneizados, separadamente, num homogeneizador de tecidos. Cada alíquota contendo esses tecidos foram submetidas ao processo de eluição viral por polietilenoglicol 6000 (PEG 6000), conforme protocolo descrito por LEWIS e METCALF (1988), com algumas modificações, conforme descrito por RIGOTTO *et al.*, (2010), onde foram utilizados 2 g de cada um dos tecidos, e estes foram homogeneizados e analisados.

Já para os fagos, três aquários com 10 L de água do mar em cada um, foram preenchidos com trinta e seis ostras, sendo uma dúzia de ostras em cada aquário. Fagos ΦX e MS2 foram inoculados, uma espécie viral por aquário, numa concentração de 5×10^3 em 10 L. As ostras permaneceram bioacumulando os fagos por 24 h, sendo coletadas 3 ostras/amostras nos tempos 0, 4, 6 e 24 h de bioacumulação. Cada amostra contendo 3 ostras/tempo, tiveram seus TD, BR e MT dissecados e homogeneizados, separadamente, num homogeneizador de tecidos. Cada alíquota de tecidos de 3 ostras cada foi armazenada a -80°C .

b.4) Quantificação viral nos tecidos das ostras

b.4.1) MNV-1

Para a recuperação e concentração do MNV-1 presente nos tecidos das ostras, elas foram submetidas ao processo de eluição viral com PEG 6000, já descrito neste trabalho (item b.3). A distribuição viral nos três tecidos foi analisada por ensaio de placa de lise (UFP) e RT-qPCR (CG), respectivamente.

A quantificação das partículas virais do MNV-1 por placa de lise foi realizada segundo descreveu Bae e Schwab, (2008). Previamente ao ensaio de placa de lise, as amostras foram submetidas aos testes de citotoxicidade às células RAW-264.7, segundo descreveu Rigotto *et al.*, (2005), para que fosse selecionada a menor diluição não citotóxica das amostras. Dessa forma, o produto resultante do processo de eluição viral das ostras por PEG 6000, denominado eluato, foi diluído de acordo com os testes de citotoxicidade realizados (1:3 em DMEM COM 2% de SFB) e 400 μ L de cada amostra foi adicionado à placa de 6 poços, em duplicata. A placa foi incubada por 1 h para a adsorção viral a 37°C/5% de CO₂, sendo cada inóculo substituído por uma camada de 2 mL de uma solução contendo 2X DMEM com 1,5% de agarose de baixo ponto de fusão (Seaplaque, Lonza, CA, EUA) suplementada com 2% de Soro Fetal Bovino (SFB), 3% de HEPES (*N*-(2-hidroxiethyl) piperazina-*N'*-(2-ácido etanosulfônico)), 2% de Aminoácidos não essenciais (AA), 2% de L-glutamina 2mM e 2% de PSA, antibióticos/antifúngico (Cultilab-penicilina G 100U/mL/sulfato de estreptomicina 100g/mL/anfotericina B 0,25g/mL). Essa primeira camada serviu para delimitar os locais onde havia a replicação viral e a lise celular. Após a solidificação da agarose, as placas foram incubadas a 37°C/5% de CO₂ por 48 h, correspondente ao ciclo de replicação do MNV-1. Decorrido esse tempo, foi adicionada uma segunda camada da mesma solução descrita, contendo agarose (2 mL), mas com a adição de uma solução de vermelho neutro a 0,01% (Sigma) para permitir a visualização das placas de lise formadas. As formações das placas de lise foram observadas a partir desse momento até 8 h após. Elas foram contadas e o título viral obtido na maior diluição, expresso em UFP/mL.

Para a quantificação das cópias de genes de MNV-1 nas ostras, por RT-qPCR, 200 μ L de cada eluato foi submetido ao processo de extração dos ácidos nucleicos presentes, através da utilização do Kit Purelink® RNA/DNA viral (Invitrogen da Life Technologies), conforme orientações do fabricante. No final do processo de extração, os ácidos nucléicos foram diluídos dez vezes e foram submetidos à RT-qPCR. As reações de RT-qPCR para MNV-1 nas amostras, obedeceram aos protocolos de tempo, temperatura, sequências e concentrações de oligonucleotídeos (iniciadores e sondas de hidrólise) descritos por Baert *et al.*, (2008). Foram utilizadas curvas padrão confeccionadas com diluições de uma sequência de interesse do MNV-1 (junção ORF1/ORF2), clonadas em plasmídeos (doadas pela Dra. Rosina Girones, Laboratório de Vírus Contaminantes de Águas e Alimentos, da Universidade de Barcelona, Espanha). Cada amostra foi analisada em duplicata e foram introduzidos controles negativos

em cada corrida. As reações de RT-qPCR ocorreram em termociclador StepOne™ Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, EUA).

b.4.2) Bacteriófagos Φ X e MS2

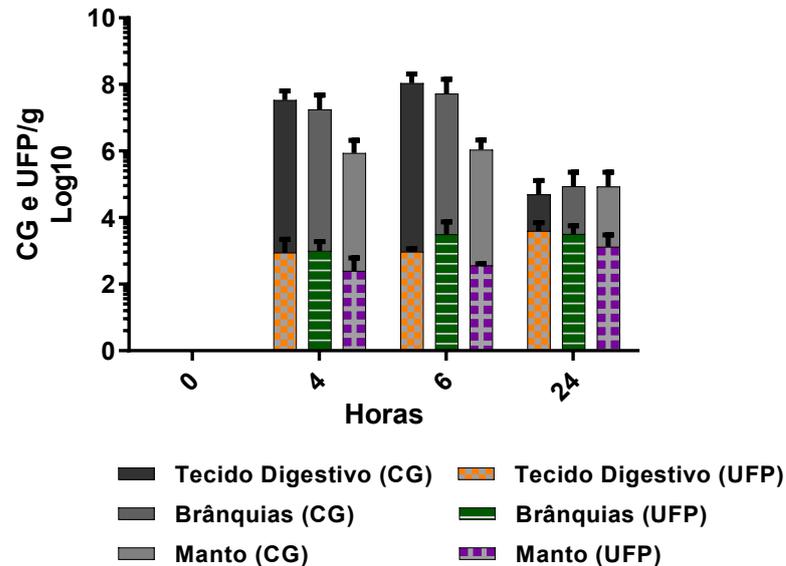
As amostras dissecadas foram aliqüotadas em microtubos de 2,0 mL (totalizando 36 amostras) e eluídas em 4 mL de caldo Triptose fosfato 100% (TPB). Cada amostra de TD, BR e MT por amostra/tempo foram homogeneizadas separadamente, com um homogeneizador de tecidos. Em seguida, essas amostras foram diluídas a -5 e plaqueadas para a quantificação de fagos pela técnica de duplo ágar segundo protocolo de Adams *et al.*, (1959). Resumidamente, 1 mL das amostras foi misturado com 1 mL de cultura de fase logarítmica de *E. coli* (ATCC 13706) e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (ATCC 14028) (Densidade Óptica 0,6) e as amostras foram cada uma adicionada à 1 mL de BHI-ágar sólido. As placas foram incubadas novamente a 37°C/16 h para permitir o aparecimento de placas. O título de fago foi determinado e expresso em UFP/g.

c) Resultados e discussão

c.1) Distribuição tecidual de controles positivos virais usados como alternativas do HNoV, após serem bioacumulados pelas ostras *C. gigas*

Tecidos de ostras foram analisados quanto à distribuição de modelos virais (MNV-1; ϕ X-174 e MS2) em TD, BR e MT após 4, 6 e 24 h de bioacumulação experimental. As partículas infecciosas de MNV-1 obtiveram maiores contagens às 6 h no TD ($1,2 \times 10^3$ UFP/g), seguido de BR e MT ($9,5 \times 10^2$ e $3,8 \times 10^2$ UFP/g, respectivamente). Apesar do MNV-1 apresentar maior concentração no TD, como outros vírus entéricos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados das concentrações do vírus nos tecidos ao longo do tempo ($P > 0,05$; ANOVA two way). A Figura 5 apresenta a distribuição de MNV-1 em ostras *C. gigas* após a bioacumulação viral.

Figura 5. Distribuição de MNV-1 em ostras *C. gigas* após bioacumulação viral realizada em tanques, onde CG é a quantificação de cópias de genes, e UFP é o número de unidades formadoras de placa infecciosas.



CG: Cópias de genes, UFP: Unidade Formadora de Placas.

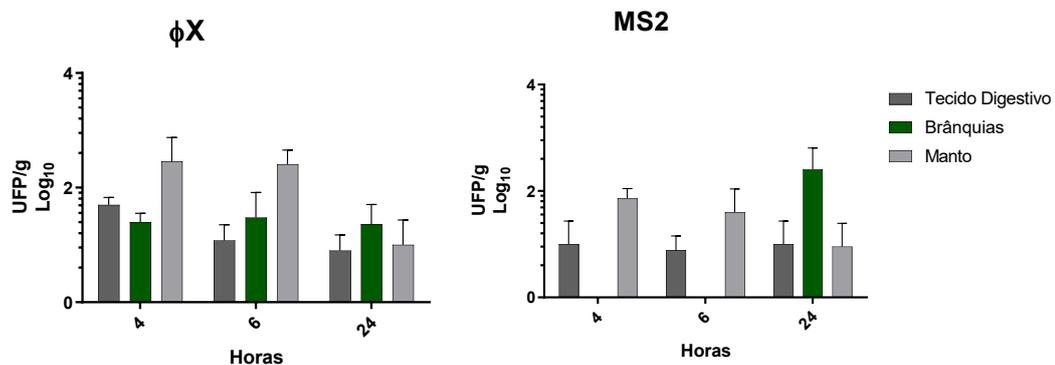
O MNV-1 foi distribuído entre os três tecidos analisados. Shwab *et al.* (1998) observaram que o HNoV estava mais concentrado nos tecidos digestivos (glândula digestiva e estômago) de ostras *Crassostrea virginica*, independentemente da quantidade adicionada ao tanque (10^3 a 10^7 PCRU), quando comparado ao músculo adutor e às células da hemolinfa. Maalouf *et al.*, (2010) compararam a distribuição de HNoV GI.1 e GII.4 VLPs (Virus Like Particles) entre TD, BR e MT de ostras *C. gigas*. E concluíram que, enquanto GI.1 foi acumulado quase exclusivamente em TD, GII.4 se distribuiu igualmente entre TD, BR e MT das ostras *C. gigas*. Estudos que avaliaram a bioacumulação e distribuição de vírus entéricos entre os tecidos de ostras (*C. gigas* e outros), focaram principalmente em genótipos HNoV (SCHWAB *et al.*, 1998; MAALOUF *et al.*, 2010; LOWMOUNG *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2018), e utilizaram técnicas moleculares nas análises. Poucos estudos avaliaram a distribuição tecidual de outros vírus entéricos, como o vírus da hepatite A (HAV) (ROMALDE *et al.*, 1994), e poliovírus (MCLEOD *et al.*, 2009), em ostras *C. gigas* ou noutras espécies de moluscos bivalves. Quando comparados aos resultados de bioacumulação de HNoV obtidos com as VLPs HNoV GII.4 (MAALOUF *et al.*, 2010), os resultados da presente pesquisa foram semelhantes aos desses autores, tendo o GII.4 se distribuído entre os três tecidos de ostras *C. gigas*. Porém,

quando comparamos com os resultados obtidos pelos mesmos autores, mas com o GI, observou-se que o MNV-1 se acumulou no TD em maior concentração, mas se diferenciou do GI, por ser acumulado também nas BR e MT das ostras.

Apesar das semelhanças moleculares entre HNoV e MNV-1, alguns pontos devem ser levados em consideração ao avaliar seu padrão de bioacumulação nas ostras. Enquanto o primeiro é geralmente adicionado aos tanques de ostras dentro de um inóculo composto por matrizes fecais ou de esgoto, o segundo faz parte de uma suspensão viral, em meio de cultura de células. Sabe-se que quando os vírus estão em matrizes líquidas, dependendo do pH do ambiente, eles tendem ou não a se ligar às partículas ao redor. As fezes e o esgoto possuem vários flocos orgânicos que podem promover essa ligação (GERBA; BETANCOURT, 2017), interferindo no processo de bioacumulação do vírus. Beninger *et al.* (2008) afirmaram que há uma seleção das partículas ingeridas pelas ostras durante o processo de filtração por elas realizado. Eles observaram que a forma, tamanho e constituição química das partículas são algumas das características que influenciam na ingestão. Então, dependendo de que tipo de partículas os vírus estão ligados, sua bioacumulação pelas ostras também pode ser afetada.

Quanto à bioacumulação dos bacteriófagos, os resultados obtidos mostraram que ocorreu maior concentração de ϕX no MT, às 4 e 6 h ($3,0 \times 10^2$ UFP/g, em ambos), e na BR do MS2 após 24 h ($2,2 \times 10^2$ UFP/g). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa comparando os resultados das concentrações de ϕX e MS2 nos tecidos ao longo do tempo ($P > 0,05$; ANOVA two way). A Figura 6 apresenta a distribuição de fagos em ostras *C. gigas*.

Figura 6. Distribuição de fagos F- específicos (MS2) e fagos Colifagos somáticos (ϕX) em ostras *C. gigas*.



Os fagos ϕ -X e MS2 foram concentrados em MT (ϕ -X) e BR (MS2) por 24 h. Doré e Lees (1995) relataram que ostras *C. gigas* naturalmente contaminada com MS2 por uma a três semanas (área de crescimento próxima ao emissário de esgoto) reteve mais fagos nos animais no TD do que BR ou MT e outros tecidos. Assim, a presença de bacteriófagos em ostras não seguiu o mesmo comportamento de bioacumulação observado para o MNV-1 e para os vírus entéricos humanos.

O protocolo de contaminação realizado por eles foi diferente na constituição do inóculo, contaminação natural e tempo de exposição, em comparação com os resultados obtidos aqui. No experimento realizado neste projeto, os fagos MS2 eram de sobrenadantes de cultura de bactérias hospedeiras. Talvez essas diferenças tenham afetado nos resultados obtidos por Doré e Lees (1995) e por esta pesquisa. Outros autores relataram a persistência de MS2 em ostras, porém processaram a carne total, sem analisar os tecidos separadamente (KINGSLEY *et al.*, 2017), como foi realizado neste estudo. Embora os bacteriófagos sejam propostos como indicadores de contaminação viral entérica em amostras de moluscos bivalves (FLANNERY *et al.*, 2009; LOWTHER *et al.*, 2019), pois sua presença pode estar correlacionada com alguns vírus entéricos, no caso de ensaio de bioacumulação o uso de MNV- 1 como controle de contaminação viral, fornecerá um padrão de bioacumulação mais parecido com o dos vírus entéricos nas ostras *C. gigas*.

Estudos reportando a distribuição desses vírus nos tecidos dos moluscos bivalves são raros e é importante conhecer de que forma isso ocorre, para a escolha de um controle positivo viral substituto adequado aos diferentes tipos de análises realizadas nestes animais: controle de recuperação durante extração e RT-qPCR, testes que avaliem a inativação e velocidade de decaimento viral nos tecidos dos animais.

d) Conclusão

Comparando o padrão de distribuição tecidual de norovírus murino (MNV-1) em ostras *Crassostrea gigas* bioacumuladas em aquários, o MNV-1 demonstrou ser um modelo viral alternativo aos norovírus humano (HNoV) por ser acumulado no tecido digestivo (TD), porém mais próximo do HNoV GII, já que também foi detectado nas brânquias (BR) e no manto (MT), corroborando o perfil de bioacumulação apresentado pelo GII, relatado em outros estudos. Já o perfil de bioacumulação dos bacteriófagos MS2 e Φ X não demonstrou similaridade com o perfil de HNoV uma vez que foram encontrados em MT e BR, não sendo acumulado em TD.

Assim conclui-se que MNV-1 é um modelo viral alternativo ao HNoV em análises de bioacumulação em TD em ostras *C. gigas*, enquanto que os bacteriófagos MS2 e Φ X são indicados para análise de bioacumulação viral analisando-se MT e BR, ou a carne total dos animais, já que não apresentaram bioacumulação em TD.

Capítulo II - Desempenho da desinfecção e valoração nutricional de ostras *C. gigas* mediado pelo processo de depuração associado a produtos de origem natural

Os experimentos descritos no Capítulo II foram divididos em três etapas: (1) Avaliação virucida dos produtos de origem natural frente ao MNV-1; (2) Utilização da solução aquosa de *C. longa*, assim como do extrato de alga *P. nurekis*, em aquários de depuração visando a inativação de MNV-1 e *E. coli*; (3) Análise do potencial antioxidante, da concentração de polifenóis e análise centesimal em ostras bioacumuladas com os produtos de origem natural (*C. longa* e *P. nurekis*).

a) Objetivos específicos

- a) Medir o decaimento de MNV-1 e *Escherichia coli* em ostras *Crassostrea gigas* durante depuração em aquários com água marinha adicionada de solução de *Curcuma longa* e extrato de alga *Planktochlorella nurekis*;
- b) Avaliar o potencial antioxidante e concentração de polifenóis das ostras *Crassostrea gigas* que permaneceram em águas contendo solução aquosa de *Curcuma longa* e extrato de alga *Planktochlorella nurekis*;
- c) Determinar a composição centesimal dos tecidos de ostras *Crassostrea gigas* após o processo de purificação com a utilização da solução aquosa de *Curcuma longa* ou extrato de alga *Planktochlorella nurekis*.

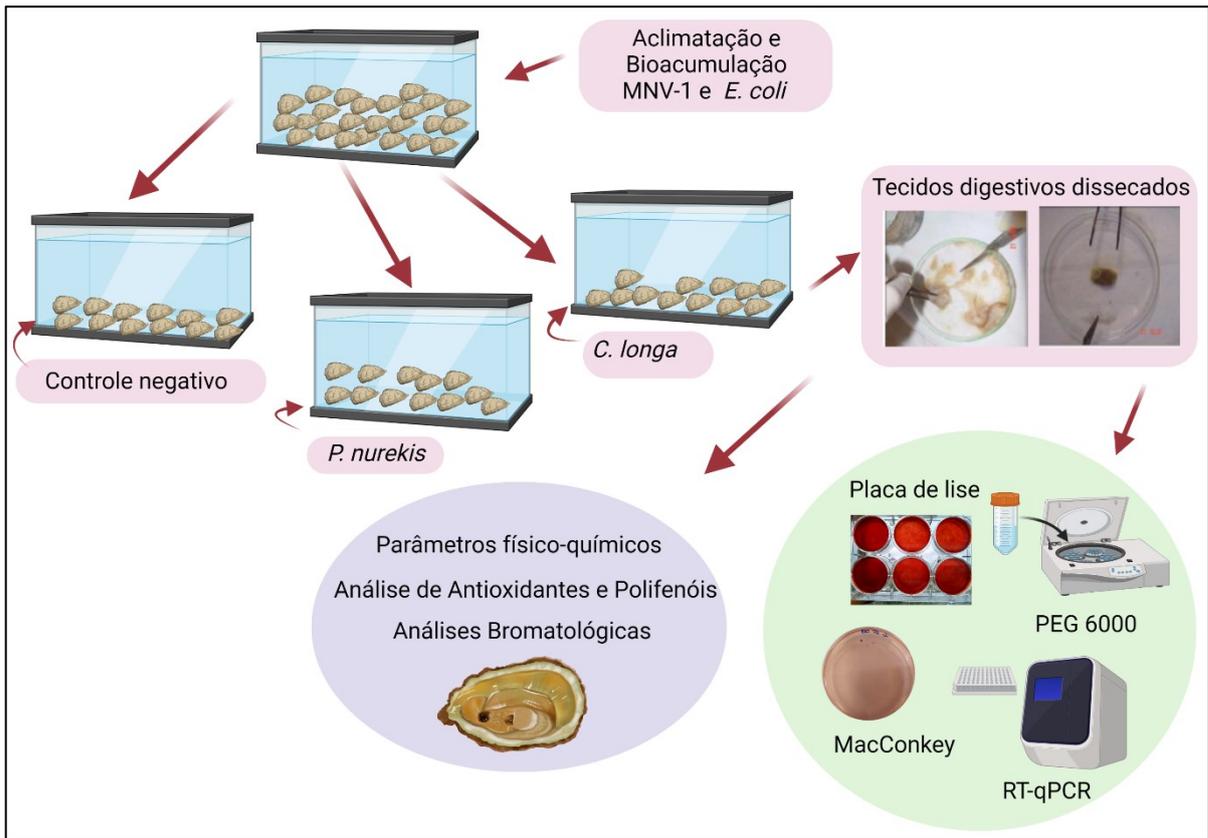
b) Metodologia

Após os resultados obtidos no capítulo I deste trabalho, sobre qual seria o melhor vírus-modelo para uso nos ensaios de bioacumulação e inativação viral em ostras *C. gigas*, no

presente capítulo foi utilizado somente o MNV-1 como controle positivo viral nos ensaios com as ostras.

A Figura 7 resume o desenho experimental do presente capítulo.

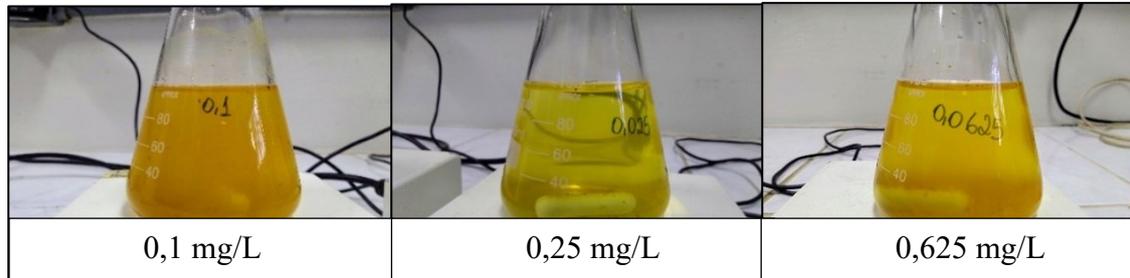
Figura 7: Resumo gráfico da metodologia, apresentando a bioacumulação viral e bacteriana, bem como o processo de depuração associado a *C. longa* e *P. nurekis* e análises de tecidos provenientes de ostras vivas.



b.1) Produtos naturais

O pó seco do rizoma de *C. longa*, com selo de produção orgânica e com 95% de pureza, foi adquirido comercialmente. Para a realização deste projeto foram selecionadas soluções contendo *C. longa* em três concentrações diferentes, com base na literatura conforme estudo de Wu *et al.*, (2015), sendo, 0,1 mg/L; 0,25 mg/L e 0,625 mg/L (Figura 8). Estas concentrações foram submetidas a testes de solubilidade em água marinha natural, onde foi feito o cálculo para a quantidade de cada concentração em 100 mL de água marinha e mantidas sob agitação por um período de uma hora. Após esse tempo foi observado a capacidade de solubilização. A concentração de 0,625 g/L foi selecionada para a realização dos experimentos.

Figura 8. Teste de solubilidade de *C. longa* em água marinha utilizando três concentrações 0,1 mg/L; 0,25 mg/L e 0,625 mg/L em 100 mL de água marinha, respectivamente.



No caso da obtenção de extrato de alga *P. nurekis*, primeiramente houve cultivo em fotobiorreatores de 10 L, expostos à luz ($99 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), em condições mixotróficas (12 h:12 h, claro:escuro), agitação contínua usando uma bomba de recirculação mecânica 1.200 Lh⁻¹ (marca Sarlobetter) em temperatura ambiente (23°C). Os fotobiorreatores foram operados em modo descontínuo usando efluentes de um sistema de tratamento anaeróbico, que foi diluído pela adição de 1,0 L em 6,0 L de água da torneira sem cloro. Os fotobiorreatores foram inoculados com $70 \pm 0,6 \text{ mgDW}$ de microalgas L⁻¹. Após onze dias da inoculação, a biomassa atingiu um peso fresco de $0,4 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$. Esta biomassa foi então colhida por centrifugação a $3.000 \times g$ (Eppendorf, 5810/5810R), congelada imediatamente (-20°C) e depois liofilizada para análise e ensaios adicionais. Um total de 20g de biomassa de *P. nurekis* foram extraídos do solvente diclorometano na proporção de 1:5 [sm1] (p:v; g:mL). Este extrato, denominado PNDE, foi seco em rotoevaporador a 50°C para remoção total do solvente e armazenado a -20°C. Foi selecionada uma concentração não citotóxica de 1,0 mg/L, conforme estudo de Michelom *et al.*, (2022) para a realização dos experimentos.

b.2) Avaliação virucida dos produtos de origem natural frente ao MNV-1

O efeito virucida do extrato seco de *C. longa* já havia sido observado por Wu *et al.*, (2015), na concentração de 10 μM , porém, ainda não havia estudos reportando esse efeito no extrato de alga *P. nurekis* e esse foi conduzido nessa dissertação de mestrado.

Este ensaio seguiu os procedimentos descritos pela EN 14476:2013+A2:2019 para avaliação de uma atividade virucida. Os títulos de vírus infecciosos foram medidos em UFP, conforme descrito pela EN 14476:2013+A2:2019. A concentração viral de 4×10^4 UFP foi testada com diferentes diluições de extrato de alga *P. nurekis* utilizando 10 $\mu\text{g/mL}$ (1:2 diluições

em série) durante 15 min em temperatura ambiente. Em seguida, a reação foi bloqueada com SFB a 10%, e 400 µL de cada diluição teste foram adicionadas às células RAW 234.7, previamente preparadas em placas de 6 poços. Após 1 h de contato com as células, o inóculo foi removido, a monocamada celular foi lavada com solução tampão fosfato-salino (PBS). As amostras foram analisadas por placa de lise, conforme protocolo já descrito no capítulo I (item b.4.1).

b.3) Sobrevivência das *C. gigas* em aquários contendo solução aquosa de *C. longa* e extrato de alga *P. nurekis*

Ensaio de sobrevivência envolvendo a utilização dos extratos na inativação de vírus e bactérias nos aquários com ostras foram realizados. Foram observadas a mortalidade e a não movimentação das valvas (conchas) das ostras que permaneceram em contato com a solução aquosa de *C. longa* e com o extrato de alga *P. nurekis* nos aquários, nas mesmas concentrações que seriam utilizadas nos ensaios de inativação, por até 24 h em contato. Para isso, foram colocadas uma dúzia de ostras em aquário com 10 L de água marinha e solução aquosa de *C. longa* numa concentração de 0,625 g/L, e uma dúzia de ostras em aquário com o mesmo volume de água marinha, adicionada de extrato de alga *P. nurekis*, com a concentração de 1,0 mg/L. Os resultados obtidos foram comparados aos dos animais que permaneceram no aquário controle, cujas águas marinhas não receberam adição dos produtos naturais.

b.4) Redução de MNV-1 mediado por solução aquosa de *C. longa* em água do mar

Para este experimento foi utilizado um aquário contendo 10 L de água marinha natural e 7×10^8 UFP de MNV-1; e um aquário contendo 10 L de água marinha natural, 7×10^8 UFP de MNV-1 e solução aquosa de *C. longa* numa concentração de 0,625 g/L. Foram coletados 1 mL da água de cada um dos aquários nos tempos 0 (antes da adição dos compostos naturais) e no tempo 24 h (após 24 h de contato). Os vírus presentes nas amostras de água marinha foram submetidos a concentração por PEG 6000 a 50% em água marinha, onde em cada alíquota coletada foi adicionada uma solução de PEG 6000 a 50% e mantida em agitação em *over night* a 4°C. As amostras foram centrifugadas (13.500 RPM/1h30min/4°C), descartado o sobrenadante e o sedimento foi dissolvido em 1 mL de água miliQ estéril. A quantificação viral e de cópias genômicas foram realizadas conforme as descritas nos métodos do capítulo I.

b.5) Ostras bioacumuladas com MNV-1 e submetidas a descontaminação através da solução aquosa de *C. longa* e extrato de alga *P. nurekis* em aquários

Três dúzias de ostras *C. gigas* após processo de aclimatação, já descrito anteriormente, foram colocadas em aquário contendo 10 L de água marinha natural e 7×10^8 UFP de MNV-1 permanecendo por 4 h para bioacumulação viral. Após esse período, uma dúzia foi transferida para um aquário contendo 10 L de água marinha natural, funcionando como um controle do processo, enquanto que a outra foi colocada num aquário contendo o mesmo volume de água marinha adicionada de uma solução aquosa de *C. longa* na concentração de 0,625 g/L. A terceira dúzia foi colocada em um aquário sob as mesmas condições do segundo, mas sendo adicionado o extrato de alga *P. nurekis* numa concentração de 1,0 mg/L. Os aquários possuíam aeração constante e permaneceram em sala climatizada durante todo o processo. Três ostras/amostras foram coletadas de cada aquário nos horários de 0, 1, 1:30, 2 e 4 h, tendo seus tecidos digestivos (TD) dissecados e formaram *pools* por amostra. A eluição e concentração dos MNV-1 presentes nos TD das ostras foram realizadas com PEG 6000, conforme descrito anteriormente no capítulo I. A quantificação viral e de cópias de genes foram realizadas conforme descrito no capítulo I.

b.6) Bioacumulação de *E. coli* em ostras usando processo de depuração associado a solução aquosa de *C. longa* e extrato de alga *P. nurekis*

Três dúzias de ostras *C. gigas* permaneceram em processo de aclimatação às condições laboratoriais, por 12 h, em um aquário contendo 20 L de água marinha natural. Posteriormente, elas foram transferidas para um aquário contendo 10 L de água marinha natural, adicionado de 5×10^5 UFC de *E. coli*, permanecendo bioacumulando essas bactérias por uma hora. Após este período, 9 ostras foram colocadas em aquário contendo 5 L de água marinha natural; 9 ostras em aquário com esse mesmo volume de água, mas adicionada da solução aquosa de *C. longa* numa concentração de 0,625 g/L; 9 ostras com o mesmo volume de água, mas com extrato de alga *P. nurekis* numa concentração de 1,0 mg/L. Decorridas 24 h de incubação, as ostras de cada aquário tiveram seus tecidos digestivos (TD) dissecados e formando um *pool* por tratamento. Em ambiente asséptico, foram adicionadas 25 g de cada amostra a 225 mL de água peptonada tamponada, para que constituíssem soluções dez vezes diluídas de cada amostra. As

amostras foram homogeneizadas e 1mL de cada uma delas foi diluída sucessivamente dez vezes em água peptonada tamponada, até a diluição 10^{-5} , para que fosse realizado o cultivo e quantificação da *E. coli* presente em cada amostra. Para isso foi inoculado 100 μ L das diluições 10^{-2} e 10^{-4} na placa com meio LB e placa com meio Macconkey. Após inoculadas, as placas foram incubadas a $35\pm 2^\circ\text{C}/48\pm 2$ h e após as 48 h de incubação foi feita a análise e contagem das colônias.

b.7) Análises físico-químicas da água dos aquários

As análises físico-químicas da água de cada aquário foram monitoradas durante todo o período de cada experimento. Os parâmetros estudados foram: pH; temperatura ($^\circ\text{C}$); salinidade (ppt); oxigênio dissolvido (mg/L); condutividade (mS), sólidos totais (ppm), amônia, sulfeto, nitrito e nitrato. Para realizar essas análises, foram utilizados: pHmetro; termômetro; medidor de condutividade salina, oxímetro e soluções colorimétricas do kit comercial Acquacombo colorimétrico da Alfacit.

b.8) Análise da atividade Antioxidante e Polifenóis totais

b.8.1) Preparo das amostras

Nove ostras foram divididas em três grupos (três ostras cada) e submetidas ao processo de depuração durante um período de 24 h, um com solução aquosa de *C. longa* em uma concentração de 0,625 g/L, um com extrato de alga *P. nurekis* com concentração de 1,0 mg/L e outro somente com água marinha (grupo controle). Essas amostras foram encaminhadas para o Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, onde foram preparadas para as análises de antioxidante e polifenóis totais, de acordo com a metodologia de Kurćubić *et al.* (2014), com modificações. Cada grupo de ostras foi homogeneizado, pesado e submetido ao processo de extração com água destilada (1:4 m/v). A extração ocorreu sob abrigo de luz e com agitação (100 rpm) por 60 min. Em seguida, cada amostra foi centrifugada a 4000 rpm por 10 min e o sobrenadante obtido foi usado na avaliação da atividade antioxidante e dos polifenóis totais. As análises de gravimetria foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi U2010, CA, USA) quanto à concentração de polifenóis totais e atividade antioxidante *in vitro*.

b.8.2) Atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante foi realizada pelo método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) de acordo com metodologia proposta por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Esse método avalia o poder de sequestro de radicais livres através da reação entre a amostra e o radical DPPH. As leituras de absorbância foram realizadas antes e após a adição da amostra ao radical DPPH em 517 nm. A absorbância foi medida em 517 nm e os resultados foram expressos em porcentagem (%) de inibição do radical segundo a Equação 1.

$$\% \text{ inibição} = 1 - (\text{Abs final} / \text{Abs inicial}) \times 100$$

b.8.3) Polifenóis totais

A concentração de polifenóis totais foi determinada de acordo com o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, com leituras da absorbância em 760 nm. Para o cálculo do teor de polifenóis totais foi utilizado uma curva padrão de ácido gálico e os resultados expressos em equivalente de ácido gálico (mg de GAE/100 g) (SINGLETON e ROSSI, 1965).

b.9) Análise centesimal

Para uma maior variabilidade de dados, três grupos distintos de ostras foram submetidos ao processo de depuração associado a solução aquosa de *C. longa* e extrato de alga *P. nurekis* por um período de 24 h, conforme descrito no item b.8.1. Toda a análise centesimal foi realizada em duplicata no Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde na Universidade do Oeste de Santa Catarina-Unoesc, campus de Joaçaba, no laboratório de bromatologia sob supervisão do Prof. Roberto Degenhardt Mestre em Ciência dos Alimentos.

b.9.1) Determinação da fração volátil (Umidade) método gravimétrico com uso de calor (105°C)

A análise de umidade foi realizada conforme metodologia proposta por Brasil, (2005). Onde, primeiro fez-se a preparação do material. Onde cápsulas de porcelana revestidas com duas folhas de papel filtro foram colocadas para secar em estufa a 105°C por uma hora, e depois foram colocadas para resfriar em dessecador. Posteriormente, a cápsula metálica com o papel filtro foi pesada, tendo seu peso anotado. Nesta mesma cápsula foi pesado cerca de cinco gramas da amostra e também anotado o seu peso. Novamente as cápsulas são colocadas na estufa a 105°C por um período de seis horas e colocadas para resfriar em dessecador e pesadas.

Após as amostras serem secas, e seus valores anotados foi feito o cálculo, onde:

P1 - Peso da cápsula

P2 – Peso da cápsula + cerca de cinco gramas da amostra

P3 – P2 - P1 (peso da amostra úmida)

P4 – Peso da amostra + amostra seca

P5 – P4 – P1 (Peso da amostra seca)

$$P5/P3 - 1 \times 100 = \text{resultado final.}$$

b.9.2) Determinação da fração de resíduos minerais fixos (Cinzas)

A análise de cinzas foi realizada conforme metodologia proposta por Brasil, (2005). Primeiro foi feita a preparação do material. Cadinhos de porcelana vazios e limpos foram calcinados em forno mufla a 800°C durante 30 min. Após isso, desligou-se a mufla e deixou esfriar até uma temperatura de 100°C. Os cadinhos foram então colocados para resfriar em dessecador e pesados na balança. Em seguida, foi adicionado cerca de uma grama da amostra e colocados novamente na mufla a 550°C e incinerou-se até obtenção de cinzas brancas. Os cadinhos foram colocados para resfriar em dessecador e pesados em balança analítica.

Após as amostras serem incineradas, e seus valores anotados foi feito o cálculo, onde:

P1 - Peso do cadinho

P2 – Peso do cadinho + cerca de cinco gramas da amostra

P3 – P2 - P1 (peso da amostra úmida)

P4 – Peso da amostra + amostra seca

P5 – P4 – P1 (Peso da amostra seca)

$$P5/P3 \times 100 = \text{resultado final.}$$

b.9.3) Determinação da fração de lipídeos (Gordura) método gravimétrico de Soxlet

A determinação da fração de lipídeos foi realizada conforme metodologia proposta por Brasil, (2005). O primeiro passo foi preparar o material a ser utilizado. Para isso, secou-se os balões do conjunto de Soxlet e o papel filtro em estufa a 105°C por uma hora. Após esse tempo, esse material foi retirado e colocado em um dessecador para resfriar. Quando os balões atingiram uma temperatura ambiente, eles foram pesados e anotou-se o valor. Então, foi pesado cerca de cinco gramas da amostra no papel filtro previamente tarado e anotou-se o peso. Posteriormente, esse material foi levado para secar em estufa, colocando o papel filtro com a amostra em cima de um vidro relógio. Uma vez as amostras secas esses papéis filtros foram dobrados formando um pequeno envelope, depois este envelope foi colocado em um cartucho. Estes cartuchos foram colocados no aparelho Soxlet com Éter Etilico por um período de seis horas para a extração de lipídios. Para saber o ponto final do processo de extração foi feito um teste colocando uma gota do solvente recém destilado numa folha de papel. Uma vez não acusado mais a presença de gordura, o éter foi retirado por destilação e os balões foram colocados em estufa a 105°C por uma hora. Então, os balões foram retirados e colocados em dessecador para resfriar e depois pesados e anotado o valor.

Após as amostras serem secas, e seus valores anotados foi feito o cálculo, onde:

$$\% \text{ Lipídeos} = [(P3 - P1) / P2] \times 100$$

b.9.4) Determinação da fração proteica (Quantificação de Compostos Nitrogenados)

A análise da fração proteica foi realizada conforme metodologia proposta por Brasil, (2005). Sobre um papel filtro foi pesado cerca de um grama da amostra e anotado o valor, e 0,4 gramas do catalisador. Após isso, foi feito um envelope com o papel filtro contendo a amostra e o catalisador e colocado em um tubo de digestão. Foi adicionado a este tubo quinze mL de Ácido Sulfúrico concentrado. O tubo foi então instalado no digestor e a temperatura foi ajustada para 400°C. Esta temperatura foi mantida até a solução adquirir uma coloração esverdeada. Completada a digestão, deixou-se os tubos esfriarem no próprio digestor em temperatura ambiente. Posteriormente, transferiu-se a solução para balão volumétrico de cem mL,

completando a marca de aferição com água destilada. Em seguida foi pipetado 20 mL para a câmara de destilação e foi adicionado um pouco de água destilada e 15 mL de Hidróxido de Sódio a 40%. A destilação foi iniciada recebendo o destilado em Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de ácido bórico a 4% e 10 gotas de indicador de proteínas. O bico do destilador ficou imerso na solução. Foi destilado aproximadamente 60 mL e titulado com solução de Ácido Clorídrico 0,1 N.

Após as amostras serem destiladas e tituladas, e seus valores anotados foi feito o cálculo, onde:

$$\% = \frac{mL\ HCL \times Fator\ de\ correção\ HCL}{Peso\ da\ amostra}$$

b.9.5) Determinação da fração de carboidratos

A determinação de carboidratos foi feita por cálculo de diferença, conforme metodologia proposta por Brasil, (2005). E para isso foi necessário utilizar os valores dos resultados das análises de proteína, gordura, cinzas e umidade. Aplicando os valores na seguinte fórmula:

$$\% \text{ Carboidratos} = (\% \text{ de proteína} + \% \text{ umidade} + \% \text{ mineral} + \% \text{ gordura}) - 100$$

b.5) Análises estatísticas

Para as análises estatísticas foram utilizados: Microsoft Excel (Microsoft® Excel 2019 for Windows®), software Prisma (GraphPad Prism 8, ANOVA two way) e software (TibCo Statistica 13.5).

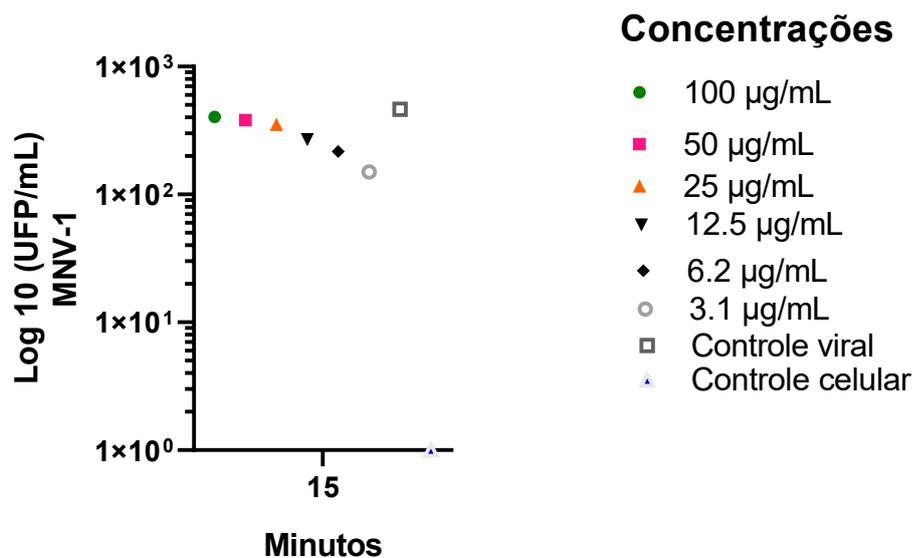
c) Resultados e discussão

c.1) Análise da atividade virucida de extrato de alga *P. nurekis* na inativação do MNV-1

Ensaio virucidas são importantes para analisar compostos que possuem potencial de inativar vírus no ambiente (VICTORIA *et al.*, 2010; RIGOTTO *et al.*, 2011; LANNA *et al.*, 2019).

O extrato de alga *P. nurekis* foi testada quanto a sua atividade virucida frente ao MNV-1. Após 15 min de contato dos vírus com *P. nurekis*, foi observado que a maior inativação viral ocorreu na concentração de 100 µg/mL, mas não alcançando 1 log₁₀ de inativação (Figura 9). Ainda, não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados das concentrações de MNV-1 ao longo do tempo ($P > 0,05$; ANOVA Two way). Considerando que o tempo de contato em que o extrato permaneceria com os vírus nas ostras seria de 24 h e, que durante o processo de filtração desses animais ele poderia ser acumulado nos tecidos desses animais juntamente com as demais partículas, optou-se por prosseguir com os testes de inativação nas ostras, em aquários.

Figura 9. Efeito virucida do extrato de alga *P. nurekis* em MNV-1, onde UFP é o número de unidades formadoras de placas de lise.



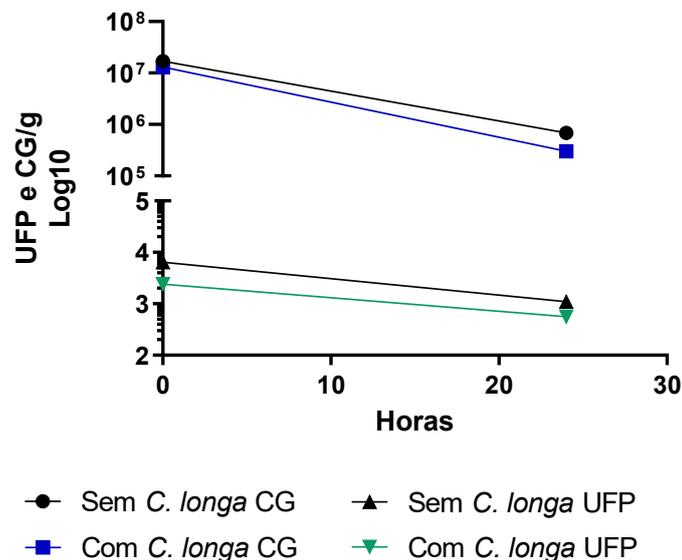
c.2) Sobrevivência das ostras *C. gigas* em aquários contendo solução aquosa de *C. longa* e extrato de alga *P. nurekis*

Nos ensaios de sobrevivência envolvendo a utilização de solução aquosa de *C. longa* e extrato de alga *P. nurekis* nos aquários com ostras. Foi observado que não houve mortalidade em nenhum dos aquários e a movimentação das valvas (conchas) continuaram ativas após 24 h de contato com a *C. longa* e *P. nurekis*.

c.3) Inativação de MNV-1 em água marinha contendo solução aquosa de *C. longa*

Foi analisado o efeito de *C. longa* na inativação de MNV-1 na água marinha. Onde, comparado com o aquário controle sem *C. longa*, o MNV-1 infeccioso decaiu 1 log₁₀ na água do mar após 24 h (Figura 10). Ainda, não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados das concentrações do vírus nas águas dos aquários ao longo do tempo (P>0,05; ANOVA two way).

Figura 10. Experimento de inativação de MNV-1 em água marinha com *C. longa*.



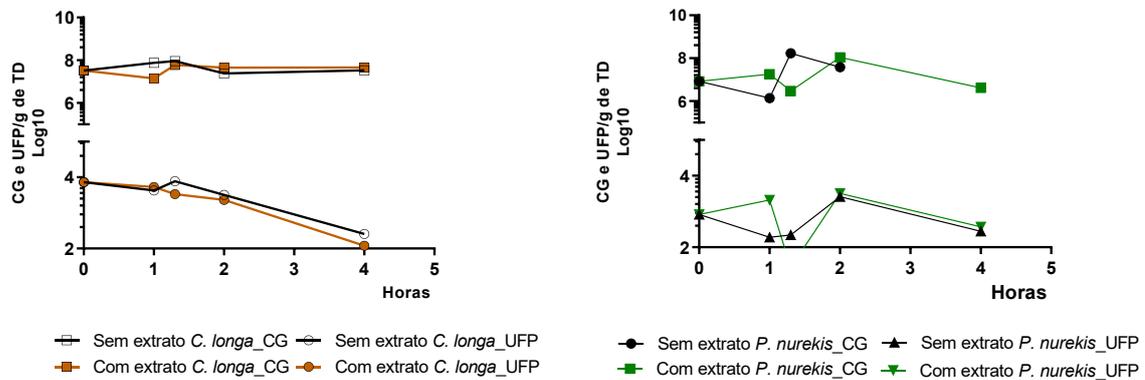
CG: Cópias de genes, UFP: Unidade Formadora de Placas.

Extratos de plantas que possuem abundantes metabólitos diversos estão sendo pesquisados pela comunidade científica em razão de suas propriedades antimicrobianas. Ainda, essas plantas têm sido avaliadas quanto suas capacidades para utilização na desinfecção de águas (JAYAPRAKASHA *et al.*, 2003; PERUMALLA e HETTIARACHCHY, 2011; D'SOUZA, 2014). Araghizadeh *et al.* (2013), atestaram que 100% das bactérias *S. mutans* foram sensíveis ao extrato de chá verde nas concentrações 6,25, 12,5, 25,0 e 50,0 mg/mL. Já em estudo analisando a atividade antiviral do extrato de chá verde, apresentou que o extrato de chá verde recém-preparado foi eficaz na inativação do norovírus murino (MNV) e hepatite A (HAV) em pH neutro e alcalino. Ainda, observou-se que o armazenamento das soluções de extrato de chá verde durante 24 h a várias condições de pH aumentou significativamente a sua atividade antiviral (FÁLCO *et al.*, 2018). Garcia (2018), estudou a inativação de 2,5 logs de adenovírus em meio aquoso após 2 h de tratamento com extrato de semente de uva (em concentração de 0,01%). Esses estudos corroboram os achados nesta pesquisa, onde *C. longa* apresentou capacidade antiviral contra o MNV-1 em água marinha. Ainda, pensando que as ostras *C. gigas* são capazes de filtrar até 10 L de água por hora, o uso de *C. longa* na água para a depuração desses moluscos poderia resultar em uma melhor desinfecção desses animais.

c.4) Inativação de MNV-1 em ostras *C. gigas* vivas, bioacumuladas com MNV-1 e posteriormente tratadas com solução aquosa de *C. longa* e extrato de alga *P. nurekis* em aquários

O TD das ostras bioacumuladas com MNV-1 foi analisado quanto à inativação deste vírus ao longo do tempo de contato com a solução aquosa de *C. longa* e extrato de alga *P. nurekis*. Os resultados dos ensaios de placa de lise demonstraram que, comparado com o aquário controle sem *C. longa*, os MNV-1 infecciosos decaíram menos de 1 log₁₀ no TD. O RT-qPCR também apontou para redução de CG viral de menos de 1 log₁₀ no TD. Ainda, não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados das concentrações do vírus no TD ao longo do tempo (P>0,05; ANOVA two way). No experimento em que foi utilizado a *P. nurekis*, observou-se que os MNV-1 infecciosos decaíram 1 log₁₀ no TD após 1 h 30 min. Já a RT-qPCR apontou uma redução viral CG de 2 log₁₀ no TD após 1 h 30 min (Figura 11). Não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os resultados das concentrações do vírus no TD ao longo do tempo (P>0,05; ANOVA two way).

Figura 11. Experimento de bioacumulação e inativação de MNV-1 em ostras *C. gigas* associado a solução aquosa de *C. longa* e extrato de alga *P. nurekis*, onde CG é a quantificação de cópias de genes, e UFP é o número de unidades formadoras de placas infecciosas.



CG: Cópias de genes, UFP: Unidade Formadora de Placas.

Diversas opções de desinfecção na água utilizada na depuração de ostras já foram utilizadas. A primeira foi a cloração, por sua alta capacidade desinfetante. No entanto, dependendo da concentração utilizada, o uso de cloro pode inibir a atividade de filtração das ostras, e além disso alterar a textura e o gosto desses animais, tendo a possibilidade também de gerar sub-produtos carcinogênicos (LEES, *et al.*, 2010).

O ozônio foi outra opção utilizada, ele não altera odor, gosto ou aparência dos animais, porém sua eficácia pode ser alterada por mudanças de temperatura e pH (LEES, *et al.*, 2010), e dependendo das concentrações utilizadas o ozônio pode interromper ou reduzir a atividade de filtração dos animais (FAO, 2008).

A utilização de radiação por luz ultravioleta é a mais conhecida. Apresenta custo baixo, não interfere no sabor ou na textura da carne dos moluscos (FAO, 2008). Mas, apenas a água que passa pela lâmpada é sujeita a ação da luz UV, além disso, microrganismos que estão dentro dos moluscos não serão afetados, a não ser que se desprendam e sejam liberados na água, já que o tratamento com UV não tem ação residual com outros métodos de desinfecção (LEES, *et al.*, 2010).

Assim, novos métodos que sejam capazes de reduzir microrganismos patogênicos em alimentos são necessários. Atualmente, pesquisadores investigam a possível utilização de extratos vegetais (FERNÁNDEZ LÓPEZ *et al.*, 2005; SUPPAKUL *et al.*, 2016; CLARKE *et al.*, 2017). Um desses extratos é a *C. longa*, alguns estudos utilizando a *C. longa* em ostras já

foram realizados. Gul; Bakht (2015), aplicaram a *C. longa* em combinação com tratamento térmico em refeições prontas para o consumo e conseguiram um alimento livre de contaminação microbiológica por um período de 90 dias, com armazenamento em temperatura ambiente. Em estudo realizado por Wu *et al.*, (2015), demonstrou que o tratamento da carne das ostras com ativação fotodinâmica da curcumina é um método potencialmente eficaz para inativar o MNV-1. Chegando a uma redução de 1-3 log de UFP/mL de MNV-1. Porém, ambos os estudos foram realizados em ostras mortas. No presente estudo, além de trabalhar com ostras vivas foi escolhido trabalhar com a cúrcuma sem utilizar ativação fotodinâmica, isto para tornar o processo mais simples e de fácil acesso para que os produtores de ostras consigam utilizar em seu dia a dia.

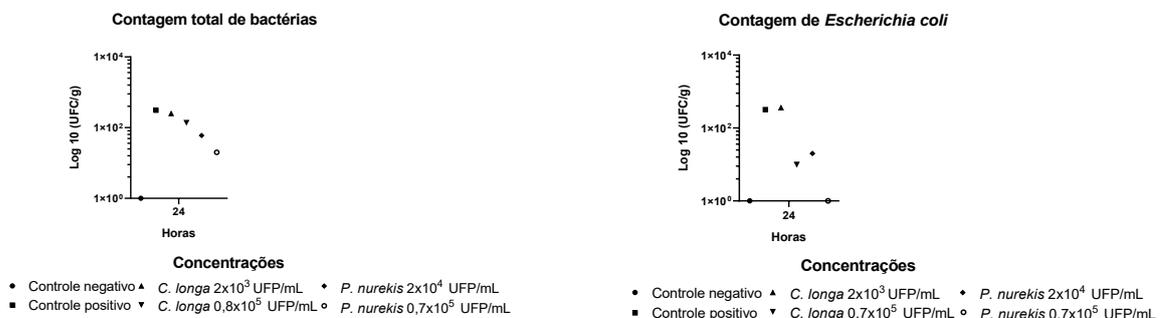
Já as algas, são uma fonte natural de compostos com propriedades antivirais, com eficiência comprovada contra vírus não envelopados e envelopados. Além disso, são de baixo custo de obtenção (ALAM *et al.*, 2021). O mecanismo antiviral de compostos oriundos de algas está relacionado à sua estrutura específica e tipo do vírus. Dessa forma, cada biomolécula de alga tem a capacidade de ter um mecanismo distinto para inativar diferentes tipos de vírus (BUCK *et al.* 2006; GRASSAUER *et al.* 2008; BRANYIKOVA *et al.*, 2018; ECCLES, 2020). Extrato etanólico da microalga *Spirulina platensis* apresentou ter efeitos antivirais contra o Adenovírus tipo 40, um vírus não envelopado (ABDO *et al.*, 2012). Alguns extratos de algas foram fornecidos para alguns tipos de camarão para reduzir o impacto do vírus da síndrome da mancha branca, esta dieta proporcionou uma melhora a imunidade inata e na resistência do camarão à infecção pelo vírus da síndrome da mancha branca (CHOTIGEAT *et al.*, 2004; IMMANUEL *et al.*, 2012; SIVAGNANAVELMURUGAN *et al.*, 2012; CHAROONNART *et al.*, 2019). Florotaninos de macroalgas foram relatados como ativos contra o norovírus murino (EOM *et al.*, 2015). Produtos de alga marrons mostraram potencial antiviral contra infecções por norovírus utilizando o Calicivírus Felino como modelo (CHOI *et al.*, 2014).

Embora a literatura já apresente resultados positivos de ensaios realizados com *C. longa* e *P. nurekis* na redução e/ou eliminação de NoV e outros vírus não envelopados, este estudo é pioneiro no uso de produtos de origem natural em ostras vivas. Os resultados mostram que *C. longa* e *P. nurekis*, possuem a capacidade de auxiliar na redução de NoV em processo de depuração de ostras, entretanto, experimentos envolvendo outras concentrações e tempos de exposição seriam necessários.

c.5) Inativação de *E. coli* em ostras usando solução aquosa de *C. longa* e extrato de alga *P. nurekis*

A partir dos resultados obtidos após contagem total de bactérias nos tecidos digestivos das ostras bioacumuladas com *E. coli* em processo de depuração associado com solução aquosa de *C. longa* e extrato de alga *P. nurekis* pode-se perceber que houve uma redução de 1 log₁₀ nas concentrações de bactérias de 2x10⁴ e 0,7x10⁵ UFC/mL no grupo tratado com *P. nurekis*. Ainda, não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados das concentrações de bactérias nos tecidos ao longo do tempo (P>0,05; ANOVA two way). E os resultados obtidos após a contagem de *E. coli* apresentaram uma redução de 1 log₁₀ na concentração de bactérias de 0,7x10⁵ UFC/mL no grupo tratado com *C. longa*. Redução de 1 log₁₀ na concentração de bactérias de 2x10⁴ UFC/mL no grupo tratado com *P. nurekis*, e ainda não apresentou crescimento microbiano na concentração de bactérias de 0,7x10⁵ UFC/mL (Figura 12). Ainda, não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados das concentrações de *E. coli* nos tecidos ao longo do tempo (P>0,05; ANOVA two way).

Figura 12. Inativação de bactérias totais e *E. coli* em ostras *C. gigas* com solução aquosa de *C. longa* e extrato de alga *P. nurekis*, onde UFC é o número de unidades formadoras de colônias.



Doenças transmitidas por alimentos têm sido uma preocupação de segurança para a saúde pública (AZZIZ-BAUMGARTNER *et al.*, 2005; KIRK *et al.*, 2016). Bactérias resistentes são um dos maiores problemas do século XXI. Prejudicando a prevenção e o tratamento eficazes de um número crescente de infecções causadas por microrganismos patogênicos (PRESTINACI *et al.*, 2015). Extratos brutos de plantas que possuem atividades antimicrobianas têm sido bastante pesquisadas, como: canela, alho, manjeriço, curry, gengibre, sálvia, mostarda que já apresentaram propriedades antimicrobianas contra bactérias Gram-positivas e

Gram-negativas (ALZOREKY e NAKAHARA, 2003; CASTRO *et al.*, 2008). Liu *et al.*, (2017) testou as atividades antimicrobianas de extrato etanólico de cinco plantas contra a *Listeria monocytogenes* em carne suína crua e os resultados mostraram que o menor número de colônias de bactérias foi observado com o extrato de cravo. Mau *et al* (2000), relatou que o extrato de cebolinha chinesa pode reduzir o crescimento de *E. coli* e outras bactérias durante o armazenamento de carnes, sucos e leite. Pesquisas comprovaram a propriedade antimicrobiana da curcumina em uma grande quantidade de microrganismos, em sua forma *in natura* para *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus epidermidis*, *P. aeruginosa* e *Yersinia enterocolitica* (HAN e YANG, 2005; DUBEY *et al.*, 2008; RAI *et al.*, 2008; PARVATHY *et al.*, 2009; BHAWANA *et al.*, 2011; HU *et al.*, 2013; MUN *et al.*, 2013).

A atividade antimicrobiana de extratos obtidos de microalgas como a *P. nurekis* é amplamente descrita na literatura científica (SOMARATHNA *et al.*, 2018; MASHJOOR *et al.*, 2015). Pesquisas sobre microalgas vêm sendo realizadas como fonte alternativa de antibióticos e conservantes. Isto porque as microalgas evoluíram em ambientes extremamente competitivos, obrigando-as a desenvolver diversas estratégias de tolerância e defesa contra microrganismos patogênicos (ČERMÁK *et al.*, 2016; FALAISE *et al.*, 2016). Os resultados obtidos com a *C. longa* confirmam achados de SINGH *et al.* (2002) e TÖNNESEN *et al.* (1987) para *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus* e *S. epidermidis*, por APISARIYAKUL *et al.* (1995), também para fungos patogênicos e leveduras. Com isso, esta pesquisa corrobora as pesquisas já descritas na literatura de que a *P. nurekis* e a *C. longa* são boas alternativas para o tratamento e/ou controle de bactérias nas ostras. Tornando seu uso possível e viável para uso por produtores de ostras.

c.6) Análise de Antioxidantes e Polifenóis

Ostras foram bioacumuladas por um período de 24 h com solução aquosa de *C. longa* e extrato de alga *P. nurekis* e posteriormente analisadas quanto a sua composição de antioxidantes e polifenóis. Com os resultados obtidos foi possível observar que comparando com o grupo controle, houve um aumento na atividade antioxidante e no teor de polifenóis totais nos grupos em que foram adicionados os produtos de origem natural associado ao processo de depuração. As análises foram realizadas em triplicata e foi feita uma média para cada grupo (Tabela 3). Foi observado uma variação de 16,32% para 45,92% na atividade antioxidante no grupo depurado com *P. nurekis*, quando comparado ao controle. Com relação

a *C. longa* observou-se uma variação de 16,32 para 43,19% da atividade antioxidante quando comprado ao grupo controle. Já na análise de polifenóis a *C. longa* obteve destaque apresentando uma variação de 88,11 para 156,47 % na composição de polifenóis. Seguido de *P. nurekis* que apresentou uma variação de 88,11 para 107,38 mg/100g na composição de polifenóis. Ainda, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) dos grupos com os produtos naturais para o grupo sem os produtos naturais ($P > 0,05$; TibCo Statística 13.5).

Tabela 3. Análises de antioxidantes e polifenóis em ostras bioacumuladas com solução aquosa de *C. longa* e extrato de alga *P. nurekis*.

AMOSTRA	AA	PT
Controle	16,32 ^d ± 0,34	88,11 ^d ± 0,36
<i>Curcuma longa</i>	43,19 ^c ± 0,29	156,47 ^a ± 0,73
<i>Planktochlorella nurekis</i>	45,92 ^b ± 0,20	107,38 ^c ± 0,96

Resultados são expressos como valores médios ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$). PT: Polifenóis totais (mg de ácido gálico/100g da amostra). AA: atividade antioxidante (Resultados expressos em porcentagem de inibição do radical DPPH).

Geralmente o consumo e a comercialização de ostras é feita em sua forma *in natura*, o que limita o comércio deste produto devendo ser consumida em até três dias quando mantida em refrigeração (PORTELLA, 2005; RAMOS, 2007; MIOTTO, 2012). Ainda, efeitos negativos de conservantes sintéticos estimulam pesquisadores para o desenvolvimento de conservantes seguros, obtidos de extratos de plantas (SAE-LEAW; BENJAKUL, 2019). Dentre os compostos fenólicos, os flavonoides são os principais compostos que despertam interesse na utilização em alimentos. Campêlo *et al.*, (2019) relata que quando esses compostos são adicionados aos alimentos, os compostos fenólicos atuam como redutores e antioxidantes nos alimentos. Segundo definição de Halliwell e Gutteridge (2007), antioxidante são “moléculas que atrasam, previnem ou removem um dano oxidativo de uma molécula alvo”. Essas biomoléculas podem ser protegidas pelos antioxidantes e podem atuar impedindo a formação dos radicais livres, inibindo a oxidação do substrato, interceptando os radicais livres gerados pelo metabolismo por meio da ação enzimática ou pelos agentes de sacrifício, que tem a função de proteger as biomoléculas. Já os compostos fenólicos são biomoléculas presentes em frutas, vegetais, grãos inteiros, sementes e especiarias (ACOSTA-ESTRADA *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2015). Estes compostos possuem atividades antioxidantes podendo ser utilizadas para várias aplicações, em áreas como: indústrias alimentícia, cosmética e farmacológica (COSTA *et al.*,

2015; CAROCHO *et al.*, 2018). Basiri *et al.*, (2015), avaliaram os efeitos do extrato de casca de romã como conservante em camarão resfriado e notaram que o extrato retardou consideravelmente as contagens de bactérias mesófilas. VAKILI; ARDAKANI (2018), utilizaram o extrato de casca de laranja na conservação do camarão de pata branca e observaram melhora nos atributos sensoriais e pH, confirmando a ação antioxidante e antimicrobiana do extrato da casca de laranja. Em estudo realizado por Lira *et al.*, (2021), onde foi avaliada a atividade antioxidante e antimicrobiana e compostos fenólicos de extratos comercial e *in natura* de *C. longa*, mostrou que os extratos etanólico da *C. longa* apresentaram boa atividade antioxidante, porém o extrato da *C. longa* em pó apresentou maior rendimento, maior atividade antioxidante e maior teor de compostos fenólicos, o que indica que a planta não perde suas propriedades durante o processamento e a estocagem. Esses resultados corroboram com os encontrados na presente pesquisa. Confirmando que extrato de *C. longa* pode ser utilizado como um antioxidante natural em ostras, auxiliando no aumento da vida útil do produto.

As algas também apresentam propriedades antioxidantes. Entre esses compostos antioxidantes destaca-se o α -tocoferol (GÓMEZ-CORONADO *et al.*, 2004). Essa biomolécula pode estar relacionada com a permeabilidade de membranas, por realizar a estabilização da membrana celular (CARBALLO-CÁRDENAS *et al.*, 2003). Sua introdução em dietas de peixes resultou em um melhor crescimento e saúde desses animais (TOCHER *et al.*, 2002). Bansemir *et al.*, (2006), analisaram extratos de 26 espécies de algas em cultivo, preparados usando solventes orgânicos com variadas polaridades (diclorometano, metanol e água), que apresentaram ser uma boa fonte de compostos biologicamente ativos. Tendo a capacidade de serem utilizados no tratamento profilático e terapêutico de doenças infecciosas em peixes. Castro *et al.* (2004), analisaram a atividade metabólica de fagócitos de *Scophthalmus maximus* que, quando expostos a extratos aquosos de *Ulva rigida*, *Enteromorpha sp.* e *Chondrus crispus*, resultaram em uma indução no aumento da atividade oxidativa celular. A alga *N. oculata* possui alto teor de EPA (Ácido Eicosapentaenóico) (ZITTELLI *et al.*, 1999; TONON *et al.*, 2002), tornando-a um excelente complemento à alimentação larvar. Ainda, esta espécie possui propriedades que a possibilitam a produção de α -tocoferol, um composto com alto poder antioxidante (DURMAZ, 2007). As microalgas do gênero *Tetraselmis* também têm a capacidade de produzir este composto (CARBALLO-CÁRDENAS *et al.*, 2003), sendo também utilizadas em aquacultura como alimento de bivalves, crustáceos e corais (EIRIK *et al.*, 1998) por seu alto teor de proteína, prolina, carotenóides e glicídios (GHEZELBASH *et al.*, 2008). Na presente pesquisa a adição de *P. nurekis* no processo de depuração em ostras *C. gigas* resultou

no aumento da atividade antioxidante e também do teor de polifenóis totais nas ostras. Com este resultado pode-se dizer que *P. nurekis* pode ser utilizada para auxiliar no aumento da composição de antioxidantes e polifenóis em ostras *C. gigas*, resultando em benefícios na saúde e aumento da vida útil desses animais.

c.7) Análise centesimal

Com os resultados obtidos pode-se observar uma diferença na composição de umidade no grupo 1 tratado com *C. longa* com uma diferença de 1,44% em relação ao controle não tratado (Tabela 4). As análises de cinzas e gordura não sofreram mudanças significativas. Na análise de proteína, o grupo 1 tratado com *P. nurekis* aumentou 1,26%. E o grupo 1 tratado com *C. longa* teve um aumento de 1,65% e no grupo 2 de 1,18%. Já na análise de carboidratos o grupo tratado com *P. nurekis* teve um aumento de 1,72% no grupo 1 e 1,10% no grupo 2. E para o grupo tratado com *C. longa* pode-se observar o aumento de 1,68% no grupo 1, e 3,14% no grupo 2 e 1,23% no grupo 3. Ainda, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) dos grupos com os produtos naturais para o grupo sem os produtos naturais ($P > 0,05$; TibCo Statística 13.5).

Tabela 4. Análise centesimal das ostras depuradas em água marinha adicionada de solução aquosa de *C. longa* e extrato de alga *P. nurekis*.

AMOSTRAS	Composição centesimal (g/100g)				
	Umidade	Cinzas	Lipídeos	Proteína	Carboidratos
Controle	83,72 ^a ±1,36	2,48 ^a ±0,12	1,74 ^a ±0,35	9,03 ^a ±0,87	3,01 ^a ±0,76
<i>P. nurekis</i>	81,83 ^a ±1,28	2,64 ^a ±0,22	2,06 ^a ±0,24	9,39 ^a ±1,02	4,27 ^a ±0,36
<i>C. longa</i>	81,86 ^a ±3,91	2,36 ^a ±0,26	1,85 ^a ±0,50	10,28 ^a ±1,04	5,03 ^a ±1,40

Resultados são expressos como valores médios ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Os carboidratos foram calculados por diferença.

As propriedades nutritivas das ostras têm sido estudadas por muitos anos (FAJARDO *et al.*, 2014). São importantes fontes de proteína e aminoácidos essenciais (FAUCONNEAU, 2002). Ainda, são considerados uma boa fonte de minerais como cálcio, iodo, magnésio, selênio e zinco (RITTENSCHÖBER *et al.*, 2013). Harel; Clayton (2004), relatam que o uso de

pequenas quantidades de microalgas na alimentação de animais auxilia a melhorar a resposta imunitária, resistência a doenças, ação antiviral e antibacteriana, função intestinal e estimulação da colonização probiótica. Microalgas dos gêneros *Spirullina* e *Chlorella* estão sendo estudadas pelo seu potencial nutricional, isto porque apresentam alta quantidade e qualidade de proteínas, contendo aminoácidos essenciais, vitaminas, minerais e ácidos gordos polinsaturados (PARISI *et al.*, 2009; ASSIS, 2012; MACHADO *et al.*, 2014). Os gêneros de microalgas *Isochrysis*, *Nannochloropsis*, *Scenedesmus* e *Tetraselmis* contém lipídios essenciais para os peixes (ALONSO *et al.*, 1994; LOURENÇO *et al.*, 1997; CHEN, 2001; KRIENITZ e WIRTH, 2006). Derner *et al.* (2006), relatam que a suplementação com biomassa de microalgas beneficia as dietas dos animais, e também pode agregar valor aos produtos finais. Ainda, microalgas demonstraram ser uma fonte de vitaminas, minerais e PUFA (Ácidos gordos polinsaturados), os quais são responsáveis por ter um desempenho positivo na qualidade de borregos e porcos (BECKER, 2007). Maithilikarpagaselvi *et al.* (2016), relataram que a curcumina teve efeito positivo sobre o perfil lipídico de ratos wistar que foram alimentados com dieta rica em frutose, e que este composto também proporcionou redução dos níveis de colesterol e diminuição da esteatose hepática. Estas pesquisas confirmam os achados desta pesquisa, visto que ostras *C. gigas* depuradas com solução aquosa de *C. longa* e extrato de alga *P. nurekis* apresentaram melhora em sua composição bromatológica, beneficiando não só a qualidade das ostras como também seu valor no mercado.

c.8) Análises Físico-químicas da água marinha

As amostras de água dos aquários foram analisadas previamente ao início dos testes de inativação viral, e após a finalização do experimento.

Os valores obtidos não apresentaram variação no perfil físico-químico das amostras de água dos aquários geradas pela adição de produtos de origem natural à matriz. Ainda, não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados das amostras de água analisadas ao longo do tempo ($P > 0,05$; ANOVA two way).

d) Conclusão

A solução aquosa de *C. longa* e extrato de alga *P. nurekis* quando associados à depuração de ostras *C. gigas* vivas promoveram inativação bacteriana e viral e auxiliando na melhoria da qualidade nutricional desses animais, o que aponta tal processo viável para elevar o potencial biotecnológico e econômico da malacocultura.

e) Referências

ABDO, S. M., HETTA, M. H., EL-SENOUSY, W. M., SALAH EL DIN, R. A., & Ali, G. H. Antiviral activity of freshwater algae. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(2), 21–25, 2012.

ACOSTA-ESTRADA, Beatriz A.; GUTIÉRREZ-URIBE, Janet A.; SERNA-SALDÍVAR, Sergio O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 152, p. 46-55, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.093>.

ADAMS, M. H. Bacteriophages. New York: Interscience Publishers, Inc.; 1959.

AGGARWAL, Bharat B.; SUNDARAM, Chitra; MALANI, Nikita; ICHIKAWA, Haruyo. CURCUMIN: the Indian solid gold. **Advances In Experimental Medicine and Biology**, [S.L.], p. 1-75, 2007. Springer US. http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5_1.

AKPOLAT, M.; TARLADACALISIR, T., Y.; UZ, Y., H.; METIN, S., M.; KIZILAY, G. Effect of curcumin in cancer treatment. *New Medical Journal*, v. 27, p. 142-147, 2010.

ALAM, Md. Asraful; PARRA-SALDIVAR, Roberto; BILAL, Muhammad; AFROZE, Chowdhury Alfi; AHMED, Md. Nasir; IQBAL, Hafiz M.N.; XU, Jingliang. Algae-Derived Bioactive Molecules for the Potential Treatment of SARS-CoV-2. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 8, p. 2134, 8 abr. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26082134>.

ALONSO, Diego Lopez; CASTILLO, Clara I. Segura; SANCHEZ, Jose L. Garcia; PEREZ, Jose A. Sanchez; CAMACHO, Francisco Garcia. Quantitative genetics of fatty acid variation in *isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae) and *phaeodactylum tricorutum* (bacillariophyceae)1. **Journal Of Phycology**, [S.L.], v. 30, n. 3, p. 553-558, jun. 1994. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-3646.1994.00553.x>.

ALZOREKY, N.S; NAKAHARA, K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.L.], v. 80, n. 3, p. 223-230, fev. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00169-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00169-1).

ANAND, Preetha; THOMAS, Sherin G.; KUNNUMAKKARA, Ajaikumar B.; SUNDARAM, Chitra; HARIKUMAR, Kuzhuvilil B.; SUNG, Bokyung; THARAKAN, Sheeja T.; MISRA, Krishna; PRIYADARSINI, Indira K.; RAJASEKHARAN, Kallikat N. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. **Biochemical Pharmacology**, [S.L.], v. 76, n. 11, p. 1590-1611, dez. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2008.08.008>.

APISARIYAKUL, Amphawan; VANITTANAKOM, Nongnuch; BUDDHASUKH, Duang. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 49, n. 3, p. 163-169, dez. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01320-2](http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741(95)01320-2).

ARAGHIZADEH, Abdolmehdi; KOHANTEB, Jamshid; FANI, Mohammad Mehdi. Inhibitory Activity of Green Tea (*Camellia sinensis*) Extract on Some Clinically Isolated Cariogenic and Periodontopathic Bacteria. **Medical Principles And Practice**, [S.L.], v. 22, n. 4, p. 368-372, 2013. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000348299>.

ASSIS, L.M. (2012) – Atividade antioxidante de extratos de microalgas *Spirulina* LEB-18 e *Chlorella* pyrenoidosa e estudo da sua nanoencapsulação em lipossomas. Tese de doutoramento. Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, Rio Grande do Sul, 85 p.

ATMAR, Robert L.; ESTES, Mary K. Diagnosis of Noncultivable Gastroenteritis Viruses, the Human Caliciviruses. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 15-37, jan. 2001. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.14.1.15-37.2001>.

AZZIZ-BAUMGARTNER, Eduardo; LINDBLADE, Kimberly; GIESEKER, Karen; ROGERS, Helen Schurz; KIESZAK, Stephanie; NJAPAU, Henry; SCHLEICHER, Rosemary; MCCOY, Leslie F.; MISORE, Ambrose; DECOCK, Kevin. Case–Control Study of an Acute Aflatoxicosis Outbreak, Kenya, 2004. **Environmental Health Perspectives**, [S.L.], v. 113, n. 12, p. 1779-1783, dez. 2005. Environmental Health Perspectives. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.8384>.

BAE, Jinhee; SCHWAB, Kellogg J. Evaluation of Murine Norovirus, Feline Calicivirus, Poliovirus, and MS2 as Surrogates for Human Norovirus in a Model of Viral Persistence in Surface Water and Groundwater. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 74, n. 2, p. 477-484, 15 jan. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02095-06>.

BAERT, Leen; WOBUS, Christiane E.; VAN COILLIE, Els; THACKRAY, Larissa B.; DEBEVERE, Johan; UYTENDAELE, Mieke. Detection of Murine Norovirus 1 by Using Plaque Assay, Transfection Assay, and Real-Time Reverse Transcription-PCR before and after Heat Exposure. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 74, n. 2, p. 543-546, 15 jan. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01039-07>.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 46, n. 2, p. 446-475, fev. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.

BALTER, Michael. Evolution on Life's Fringes. **Science**, [S.L.], v. 289, n. 5486, p. 1866-1866, 15 set. 2000. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.289.5486.1866>.

BANSEMIR, Anne; BLUME, Maja; SCHRÖDER, Susanne; LINDEQUIST, Ulrike. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. **Aquaculture**, [S.L.], v. 252, n. 1, p. 79-84, mar. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.051>.

BASIRI, Sara; SHEKARFOROUSH, Seyed Shahram; AMINLARI, Mahmoud; AKBARI, Sohrab. The effect of pomegranate peel extract (PPE) on the polyphenol oxidase (PPO) and quality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during refrigerated storage. **Lwt - Food Science And Technology**, [S.L.], v. 60, n. 2, p. 1025-1033, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.043>.

BAYAT, Fereshteh; DIDAR, Tohid F.; HOSSEINIDOUST, Zeinab. Emerging investigator series: bacteriophages as nano engineering tools for quality monitoring and pathogen detection in water and wastewater. **Environmental Science: Nano**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 367-389, 2021. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/d0en00962h>.

BECKER, E.W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, [S.L.], v. 25, n. 2, p. 207-210, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>.

BENINGER, Peter G.; VALDIZAN, Alexandra; DECOTTIGNIES, Priscilla; COGNIE, Bruno. Impact of seston characteristics on qualitative particle selection sites and efficiencies in the pseudolamellibranch bivalve *Crassostrea gigas*. **Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology**, [S.L.], v. 360, n. 1, p. 9-14, maio 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2008.03.003>.

BERGTHORSSON, U.; OCHMAN, H. Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. **Molecular Biology And Evolution**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 6-16, 1 jan. 1998. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025847>.

BESEDNOVA, Natalya N.; ANDRYUKOV, Boris G.; ZAPOROZHETS, Tatyana S.; KRYZHANOVSKY, Sergey P.; FEDYANINA, Ludmila N.; KUZNETSOVA, Tatyana A.; ZVYAGINTSEVA, Tatyana N.; SHCHELKANOV, Mikhail Yu. Antiviral Effects of Polyphenols from Marine Algae. **Biomedicines**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 200, 17 fev. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines9020200>.

BHAWANA; BASNIWAL, Rupesh Kumar; BUTTAR, Harpreet Singh; JAIN, V. K.; JAIN, Nidhi. Curcumin Nanoparticles: preparation, characterization, and antimicrobial study. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 59, n. 5, p. 2056-2061, 15 fev. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf104402t>.

BOSCH, Albert; GUIX, Susana; SANO, Daisuke; PINTÓ, Rosa M. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. **Current Opinion In Biotechnology**, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 295-301, jun. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2008.04.006>.

BOSCH, Albert; SÁNCHEZ, Gloria; ABBASZADEGAN, Morteza; CARDUCCI, Annalaura; GUIX, Susana; GUYADER, Françoise S. Le; NETSHIKWETA, Rembuluwani; PINTÓ, Rosa M.; POEL, Wim H. M. van Der; RUTJES, Saskia. Analytical Methods for Virus Detection in Water and Food. **Food Analytical Methods**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 4-12, 29 set. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-010-9161-5>.

BRAGA, Mara E. M.; LEAL, Patrícia F.; CARVALHO, João E.; MEIRELES, M. Angela A. Comparison of Yield, Composition, and Antioxidant Activity of *Turmeric* (*Curcuma longa* L.) Extracts Obtained Using Various Techniques. **Journal Of Agricultural and Food Chemistry**, [S.L.], v. 51, n. 22, p. 6604-6611, 13 set. 2003. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf0345550>.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.e.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lwt - Food Science and Technology**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0023-6438\(95\)80008-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0023-6438(95)80008-5).

BRANYIKOVA, Irena; PROCHAZKOVA, Gita; POTOVAR, Tomas; JEZKOVA, Zuzana; BRANYIK, Tomas. Harvesting of Microalgae by Flocculation. **Fermentation**, [S.L.], v. 4, n. 4, p. 93, 9 nov. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/fermentation4040093>.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. IV Edição. Brasília: ANVISA/Instituto Adolfo Lutz. 1018p. 2005.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Portaria nº 204, de 28 de junho de 2012. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 29 jun. 2012.

BUCK, Christopher B; THOMPSON, Cynthia D; ROBERTS, Jeffrey N; MÜLLER, Martin; LOWY, Douglas R; SCHILLER, John T. Carrageenan Is a Potent Inhibitor of Papillomavirus Infection. **Plos Pathogens**, [S.L.], v. 2, n. 7, p. 671-680, 14 jul. 2006. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0020069>.

BURKHARDT, W; WATKINS, W D; RIPPEY, S R. Seasonal effects on accumulation of microbial indicator organisms by Mercenaria. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 58, n. 3, p. 826-831, mar. 1992. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.58.3.826-831.1992>.

CALENDER, R. (1988) *The Bacteriophages*, Vol. I. New York, NY: Plenum Press.

CAMPÊLO, M. C. S.; MEDEIROS, J. M. S.; SILVA, J. B. A. Natural products in food preservation. *International Food Research Journal*, v. 26, n. 1, p. 41-46, 2019.

CAMPOS, Carlos J. A.; LEES, David N. Environmental Transmission of Human Noroviruses in Shellfish Waters. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 80, n. 12, p. 3552-3561, 4 abr. 2014. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.04188-13>.

CANNON, Jennifer L.; PAPAFRAGKOU, Efstathia; PARK, Geunwoo W.; OSBORNE, Jason; JAYKUS, Lee-Ann; VINJÉ, Jan. Surrogates for the Study of Norovirus Stability and

Inactivation in the Environment: a comparison of murine norovirus and feline calicivirus. **Journal Of Food Protection**, [S.L.], v. 69, n. 11, p. 2761-2765, 1 nov. 2006. International Association for Food Protection. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x-69.11.2761>.

CARBALLO-CÁRDENAS, Eira C.; TUAN, Pham Minh; JANSSEN, Marcel; WIJFFELS, René H. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. **Biomolecular Engineering**, [S.L.], v. 20, n. 4-6, p. 139-147, jul. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1389-0344\(03\)00040-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1389-0344(03)00040-6).

CAROCHO, Márcio; MORALES, Patricia; FERREIRA, Isabel C.F.R. Antioxidants: reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 71, p. 107-120, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.008>.

CARTER, J. B.; SAUNDERS, V. A. Virology: Principles and Applications. Londres: John Wiley & Sons Ltd; 2007.

CASSINI, A. *et al.* Mortes atribuíveis e anos de vida ajustados por incapacidade causados por infecções por bactérias resistentes a antibióticos na UE e no espaço econômico europeu em 2015: uma análise de modelagem em nível populacional. *Lanceta Infect. Des.* v. 19, p. 56-66, 2019.

CASTRO, A.A.; PAGANI, G.D. secagem e composição química da cabeça de camarão (*Litopenaeus vannamei* Boone) a diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 123-129, 30 dez. 2004. Revista Brasileira de Productos Agroindustriais. <http://dx.doi.org/10.15871/1517-8595/rbpa.v6n2p123-129>.

CASTRO, S.B.R.; LEAL, C.A.G.; FREIRE, F.R.; CARVALHO, D.A.; OLIVEIRA, D.F.; FIGUEIREDO, H.C.P. Antibacterial activity of plant extracts from Brazil against fish pathogenic bacteria. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 39, n. 4, p. 756-760, dez. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822008000400030>.

CENTRO DE SOCIOECONOMIA E PLANEJAMENTO AGRÍCOLA. Cedap. Síntese anual de agricultura de Santa Catarina. c2019-2020 Disponível em: https://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepa/publicacoes/Sintese_2019_20.pdf Acesso em: 05 de nov. de 2021.

ČERMÁK, L.; PRAŽÁKOVÁ, Š.; MAROUNEK, M.; SKŘIVAN, M.; SKŘIVANOVÁ, E. Effect of green alga *Planktochlorella nurekis* on selected bacteria revealed antibacterial activity in vitro. **Czech Journal of Animal Science**, [S.L.], v. 60, n. 10, p. 427-435, 15 jul. 2016. Czech Academy of Agricultural Sciences. <http://dx.doi.org/10.17221/8522-cjas>.

CHAROONNART, Patai; WORAKAJIT, Nichakorn; ZEDLER, Julie A. Z.; MEETAM, Metha; ROBINSON, Colin; SAKSMERPROME, Vanvimon. Generation of microalga *Chlamydomonas reinhardtii* expressing shrimp antiviral dsRNA without supplementation of antibiotics. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-8, 28 fev. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-39539-x>.

CHEN, Yean-Chang. Immobilized microalga *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta, Chlorococcales) for long-term storage and for application for water quality control in fish culture. **Aquaculture**, [S.L.], v. 195, n. 1-2, p. 71-80, abr. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486\(00\)00540-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486(00)00540-8).

CHHABRA, Preeti; GRAAF, Miranda de; PARRA, Gabriel I.; CHAN, Martin Chi-Wai; GREEN, Kim; MARTELLA, Vito; WANG, Qiuhong; WHITE, Peter A.; KATAYAMA, Kazuhiko; VENNEMA, Harry. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. **Journal Of General Virology**, [S.L.], v. 100, n. 10, p. 1393-1406, 1 out. 2019. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jgv.0.001318>.

CHO, H. G.; LEE, S. G.; LEE, M. Y.; HUR, E. S.; LEE, J. S.; PARK, P. H.; PARK, Y. B.; YOON, M. H.; PAIK, S. Y. An outbreak of norovirus infection associated with fermented oyster consumption in South Korea, 2013. **Epidemiology And Infection**, [S.L.], v. 144, n. 13, p. 2759-2764, 2 fev. 2016. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0950268816000170>.

CHOI, Y., KIM, E., MOON, S., CHOI, J. D., LEE, M. S., & KIM, Y. M. (2014). Phaeophyta extracts exhibit antiviral activity against feline calicivirus. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 17(1), 155–158. <https://doi.org/10.5657/FAS.2014.0155>.

CHOTIGEAT, Wilaiwan; TONGSUPA, Suprapa; SUPAMATAYA, Kidchakan; PHONGDARA, Amornrat. Effect of Fucoidan on Disease Resistance of Black Tiger Shrimp. **Aquaculture**, [S.L.], v. 233, n. 1-4, p. 23-30, abr. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.025>.

CLARKE, David; TYUFTIN, Andrey A.; CRUZ-ROMERO, Malco C.; BOLTON, Declan; FANNING, Seamus; PANKAJ, Shashi K.; BUENO-FERRER, Carmen; CULLEN, Patrick J.; KERRY, Joe P. Surface attachment of active antimicrobial coatings onto conventional plastic-based laminates and performance assessment of these materials on the storage life of vacuum packaged beef sub-primals. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 62, p. 196-201, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.022>.

CLOKIE, Martha R.J.; MILLARD, Andrew D.; LETAROV, Andrey V.; HEAPHY, Shaun. Phages in nature. **Bacteriophage**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 31-45, jan. 2011. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/bact.1.1.14942>.

CONAMA, 2005. Resolução n 357/2005. Diário Of. da União 58–63. doi:10.1073/pnas.0703993104

COOK, Nigel; KNIGHT, Angus; RICHARDS, Gary P. Persistence and Elimination of Human Norovirus in Food and on Food Contact Surfaces: a critical review. **Journal Of Food Protection**, [S.L.], v. 79, n. 7, p. 1273-1294, 1 jul. 2016. International Association for Food Protection. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-15-570>.

CORRÊA, A. Vírus entéricos em moluscos bivalves: estudos sobre a desinfecção de ostras e água do mar em um sistema de depuração. Tese (doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Florianópolis, 2010.

COSTA, D. Carvalho; COSTA, H.s.; ALBUQUERQUE, T. Gonçalves; RAMOS, F.; CASTILHO, M.C.; SANCHES-SILVA, A. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 45, n. 2, p. 336-354, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.009>.

COSTA, Samya Thalita Picanço da; FUMIAN, Tulio Machado; LIMA, Ian Carlos Gomes de; SIQUEIRA, Jones Anderson Monteiro; SILVA, Luciana Damascena da; HERNÁNDEZ, Juliana das Mercês; LUCENA, Maria Silvia Souza de; REYMÃO, Tammy Kathlyn Amaral; SOARES, Luana da Silva; MASCARENHAS, Joana D'arc Pereira. High prevalence of norovirus in children with sporadic acute gastroenteritis in Manaus, Amazon Region, northern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 112, n. 6, p. 391-395, jun. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760160357>.

COSTANTINI, Veronica; LOISY, Fabienne; JOENS, Lynn; GUYADER, Françoise S. Le; SAIF, Linda J. Human and Animal Enteric Caliciviruses in Oysters from Different Coastal Regions of the United States. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 72, n. 3, p. 1800-1809, mar. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.72.3.1800-1809.2006>.

CROCI, L; DEMEDICI, D; DIPASQUALE, S; TOTI, L. Resistance of hepatitis A virus in mussels subjected to different domestic cookings. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.L.], v. 105, n. 2, p. 139-144, 25 nov. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.008>.

DANG, Hien T.T.; TARABARA, Volodymyr V. Virus deposition onto polyelectrolyte-coated surfaces: a study with bacteriophage ms2. **Journal Of Colloid And Interface Science**, [S.L.], v. 540, p. 155-166, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2018.12.107>.

DAWSON, D.J.; PAISH, A.; STAFFELL, L.M.; SEYMOUR, I.J.; APPLETON, H. Survival of viruses on fresh produce, using MS2 as a surrogate for norovirus. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 98, n. 1, p. 203-209, jan. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02439.x>.

DELBRÜCK, Max. Bacterial Viruses (Bacteriophages). **Advances In Enzymology - And Related Areas Of Molecular Biology**, [S.L.], p. 1-32, 22 nov. 2006. John Wiley & Sons, Inc. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470122471.ch1>.

DE MORAES TAVARES, T; DE PAULA CARDOSO, D. D. D; DIEDERICHSEN DE BRITO, W. M. Enteric viroses vehiculated by water: microbiological aspects and water Quality control. *Revista de Patologia Tropical*. Goiás, v. 34, n. 2, p. 85-104, 2005.

DERNER, Roberto Bianchini; OHSE, Silvana; VILLELA, Maurício; CARVALHO, Sabrina Matos de; FETT, Roseane. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 36, n. 6, p. 1959-1967, dez. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782006000600050>.

D'HERELLE. The Bacteriophage and its Behaviour. **Nature**, [S.L.], v. 118, n. 2962, p. 183-185, ago. 1926. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1038/118183a0>

DORÉ, W J; LEES, D N. Behavior of *Escherichia coli* and male-specific bacteriophage in environmentally contaminated bivalve molluscs before and after depuration. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 61, n. 8, p. 2830-2834, ago. 1995. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.61.8.2830-2834.1995>.

DORÉ, William J.; HENSHILWOOD, Kathleen; LEES, David N. Evaluation of F-Specific RNA Bacteriophage as a Candidate Human Enteric Virus Indicator for Bivalve Molluscan Shellfish. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 66, n. 4, p. 1280-1285, abr. 2000. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.66.4.1280-1285.2000>.

D'SOUZA, Doris H. Phytochemicals for the control of human enteric viruses. **Current Opinion In Virology**, [S.L.], v. 4, p. 44-49, fev. 2014. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2013.12.006>.

DUBEY, Shiv K.; SHARMA, Anuj K.; NARAIN, Upma; MISRA, Krishna; PATI, Uttam. Design, synthesis and characterization of some bioactive conjugates of curcumin with glycine, glutamic acid, valine and demethylenated piperic acid and study of their antimicrobial and antiproliferative properties. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 43, n. 9, p. 1837-1846, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.11.027>.

DURAN, A.e.; MUNIESA, M.; MENDEZ, X.; VALERO, F.; LUCENA, F.; JOFRE, J. Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 92, n. 2, p. 338-347, fev. 2002. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01536.x>.

DURMAZ, Yaşar. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. **Aquaculture**, [S.L.], v. 272, n. 1-4, p. 717-722, nov. 2007. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.213>.

ECCLES, Ronald. Iota-Carrageenan as an Antiviral Treatment for the Common Cold. **The Open Virology Journal**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 9-15, 4 maio 2020. Bentham Science Publishers Ltd. <http://dx.doi.org/10.2174/1874357902014010009>.

EIRIK, O; GILLES; K & HAMILTO, J. K. 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds. *J. Mar. Biotechnol.* 7: 65-70.

EOM, Sung-Hwan; MOON, Sun-Young; LEE, Dae-Sung; KIM, Hyo-Jung; PARK, Kunbawui; LEE, Eun-Woo; KIM, Tae Hoon; CHUNG, Yong-Hyun; LEE, Myung-Suk; KIM, Young-Mog. In vitro antiviral activity of dieckol and phlorofucofuroeckol-A isolated from edible brown alga *Eisenia bicyclis* against murine norovirus. **Algae**, [S.L.], v. 30, n. 3, p. 241-246, 15 set. 2015. The Korean Society of Phycology.
<http://dx.doi.org/10.4490/algae.2015.30.3.241>.

FAJARDO, Paula; ATANASSOVA, Miroslava; GARRIDO-MAESTU, Alejandro; WORTNER-SMITH, Tim; COTTERILL, Jane; CABADO, Ana G. Bacteria isolated from shellfish digestive gland with antipathogenic activity as candidates to increase the efficiency of shellfish depuration process. **Food Control**, [S.L.], v. 46, p. 272-281, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.038>.

FALAISE, Charlotte ; FRANÇOIS, Cyrille ; TRAVERS, Marie-Agnès ; MORGA, Benjamin ; HAURE, Joël ; TREMBLAY, Réjean ; TURCOTTE, François ; PASETTO, Pamela ; GASTINEAU, Romain ; HARDIVILLIER, Yann. Antimicrobial Compounds from Eukaryotic Microalgae against Human Pathogens and Diseases in Aquaculture. **Marine Drugs**, [S.L.], v. 14, n. 9, p. 159, 2 set. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md14090159>.

FALCÓ, Irene; RANDAZZO, Walter; GÓMEZ-MASCARAQUE, Laura G.; AZNAR, Rosa; LÓPEZ-RUBIO, Amparo; SÁNCHEZ, Gloria. Fostering the antiviral activity of green tea extract for sanitizing purposes through controlled storage conditions. **Food Control**, [S.L.], v. 84, p. 485-492, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.08.037>.

FAUCONNEAU, B. Health value and safety quality of aquaculture products. **Revue De Medecine Veterinaire**. Toulouse, v. 153, n. 5, p. 331-336, 2002.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; ZHI, N.; ALESON-CARBONELL, L.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A.; KURI, V. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. **Meat Science**, [S.L.], v. 69, n. 3, p. 371-380, mar. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.08.004>.

FERREIRA, Mônica Simões Rocha; XAVIER, Maria da Penha Trindade Pinheiro; TINGA, Anna Carolina de Castro; ROSE, Tatiana Lundgren; FUMIAN, Tulio Machado; FIALHO, Alexandre Madi; ASSIS, Rosane Maria de; COSTA, Filipe Aníbal Carvalho; OLIVEIRA, Solange Artimos de; LEITE, José Paulo Gagliardi. Assessment of Gastroenteric Viruses Frequency in a Children's Day Care Center in Rio De Janeiro, Brazil: a fifteen-year study (1994-2008). **Plos One**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 33754, 20 mar. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0033754>.

FLANNERY, John; KEAVENEY, Sinéad; DORÉ, William. Use of FRNA Bacteriophages to Indicate the Risk of Norovirus Contamination in Irish Oysters. **Journal Of Food Protection**, [S.L.], v. 72, n. 11, p. 2358-2362, 1 nov. 2009. International Association for Food Protection. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x-72.11.2358>.

FLORÊNCIO, Valéria; VIEIRA, Luciana; LIMA, Alessandra. Doença diarreica aguda por norovirus. Subsecretaria de Saúde. Gerência de informações estratégicas em Saúde. 2021. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/files//conecta-sus/produtos-tecnicos/I%20I-%202021/Doen%C3%A7a%20Diarr%C3%A9ica%20Aguda%20por%20Norov%C3%ADrus.pdf>. Acesso em: 25 de ago. de 2022.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITADE NATIONS (FAO). Bivalve depuration: fundamental and practical aspects. **Fisherses Technical Paper**, Rome, 2008.

FOOD STANDARD AGENCY. Shellfish classification How production areas are classified, the method of treatment and how to apply for classification [Internet]. FSA. 2020. Available from: <https://www.food.gov.uk/business-guidance/shellfish-classification> Acesso em: 05 de nov. de 2021.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAO. 2020. Disponível em: <https://www.seafoodbrasil.com.br/especial-sofia-2020-aquicultura-crece-53-por-ano-desde-2000> Acesso em: 05 de nov. de 2021.

FUHRMAN, Jed A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. **Nature**, [S.L.], v. 399, n. 6736, p. 541-548, jun. 1999. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/21119>.

FUMIAN, Tulio Machado; LEITE, José Paulo G.; MARIN, Victor Augustus; MIAGOSTOVICH, Marize Pereira. A rapid procedure for detecting noroviruses from cheese and fresh lettuce. **Journal Of Virological Methods**, [S.L.], v. 155, n. 1, p. 39-43, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.09.026>.

FUSCO, Giovanna; BARTOLO, Ilaria di; CIOFFI, Barbara; IANIRO, Giovanni; PALERMO, Pierpaolo; MONINI, Marina; AMOROSO, Maria Grazia. Prevalence of Foodborne Viruses in Mussels in Southern Italy. **Food And Environmental Virology**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 187-194, 4 jan. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-016-9277-x>.

GALLIMORE, Chris I.; CHEESBROUGH, John S.; LAMDEN, Kenneth; BINGHAM, Chris; GRAY, Jim J. Multiple norovirus genotypes characterised from an oyster-associated outbreak of gastroenteritis. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.L.], v. 103, n. 3, p. 323-330, set. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.003>.

GARCIA, L. A.T. Percepção pública e qualidade da água distribuída em Florianópolis, SC: avaliação e proposição de alternativas de tratamento. (Tese de Doutorado) Programa de Biotecnologia e Biociências - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2018.

GERBA, Charles P.; BETANCOURT, Walter Q. Viral Aggregation: impact on virus behavior in the environment. **Environmental Science & Technology**, [S.L.], v. 51, n. 13, p. 7318-7325, 21 jun. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.6b05835>.

GHEZELBASH, F; FARBOODNIA, T; HEIDARI R & AGH, N. 2009. Biochemical Effects of different salinities and luminance on green microalgae *Tetraselmis chuii*. *Research Journal of Biological Sciences* 3(2): 217-221.

GIRARD, Maryline; MORALES-RAYAS, Rocío; JEAN, Julie. Comparison of RNA Extraction Methods for the Detection of a Norovirus Surrogate in Ready-to-Eat Foods. **Foodborne Pathogens And Disease**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 47-54, jan. 2013. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2011.1105>.

GOEL, Ajay; AGGARWAL, Bharat B. Curcumin, the Golden Spice From Indian Saffron, Is a Chemosensitizer and Radiosensitizer for Tumors and Chemoprotector and Radioprotector

for Normal Organs. **Nutrition And Cancer**, [S.L.], v. 62, n. 7, p. 919-930, 23 set. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2010.509835>.

GOMEZ-CORONADO, D; IBANEZ, E; RUPEREZ, F; BARBAS, C. Tocopherol measurement in edible products of vegetable origin. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1054, n. 1-2, p. 227-233, 29 out. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673\(04\)01424-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673(04)01424-4).

GONELIMALI, Faraja D.; LIN, Jiheng; MIAO, Wenhua; XUAN, Jinghu; CHARLES, Fedrick; CHEN, Meiling; HATAB, Shaimaa R. Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 9, n. 1, 24 jul. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.01639>.

GOVINDARAJAN, V.s.; STAHL, William H. Turmeric — chemistry, technology, and quality. **C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 199-301, jun. 1980. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398009527278>.

GRABOW, Wok. Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. **Water Sa**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 251-268, 15 abr. 2004. Academy of Science of South Africa. <http://dx.doi.org/10.4314/wsa.v27i2.4999>.

GRASSAUER, Andreas; WEINMUELLNER, Regina; MEIER, Christiane; PRETSCH, Alexander; PRIESCHL-GRASSAUER, Eva; UNGER, Hermann. Iota-Carrageenan is a potent inhibitor of rhinovirus infection. **Virology Journal**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 107, 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422x-5-107>.

GRIFFIN, Dale W.; DONALDSON, Kim A.; PAUL, John H.; ROSE, Joan B. Pathogenic Human Viruses in Coastal Waters. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 129-143, jan. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.16.1.129-143.2003>.

GUILLOIS-BÉCEL, Y; COUTURIER, E; SAUX, J C Le; ROQUE-AFONSO, A M; GUYADER, F s Le; GOAS, A Le; PERNÈS, J; BECHEC, S Le; A BRIAND; ROBERT, C. An oyster-associated hepatitis A outbreak in France in 2007. **Eurosurveillance**, [S.L.], v. 14, n. 10, p. 931-936, 12 mar. 2009. European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC). <http://dx.doi.org/10.2807/ese.14.10.19144-en>.

GUL, P.; BAKHT, J. Antimicrobial activity of turmeric extract and its potential use in food industry. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 4, p. 2272–2279, 1 abr. 2015.

GUYADER, Françoise S. Le ; LOISY, Fabienne ; ATMAR, Robert L. ; HUTSON, Anne M. ; ESTES, Mary K. ; RUVOËN-CLOUET, Nathalie ; POMMEPUY, Monique ; PENDU, Jacques Le. Norwalk Virus–specific Binding to Oyster Digestive Tissues. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 12, n. 6, p. 931-936, jun. 2006. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid1206.051519>.

GUYADER, Françoise s Le ; ATMAR, Robert L ; PENDU, Jacques Le. Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play. **Current Opinion in**

Virology, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 103-110, fev. 2012. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.029>.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4. ed. Oxford: Clarendon Press, 2007.

HAN, S; YANG, Y. Antimicrobial activity of wool fabric treated with curcumin. *Dyes and Pigments*, v. 64, n. 2, p. 157-161, fev. 2005.

HAREL, M; CLAYTON, D. 2004. Feed formulation for terrestrial and aquatic animals. US Patent 20070082008 (WO/2004/080196).

HAVELAAR, A H; VAN OLPHEN, M; DROST, Y C. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 59, n. 9, p. 2956-2962, set. 1993. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.59.9.2956-2962.1993>.

HU, Ping; HUANG, Ping; CHEN, Min Wei. Curcumin reduces *Streptococcus mutans* biofilm formation by inhibiting sortase A activity. **Archives Of Oral Biology**, [S.L.], v. 58, n. 10, p. 1343-1348, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.05.004>.

HUTSON, Anne M; ATMAR, Robert L; ESTES, Mary K. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. **Trends In Microbiology**, [S.L.], v. 12, n. 6, p. 279-287, jun. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2004.04.005>.

IAWPRC. Bacteriophages as model viruses in water quality control. **Water Research**, [S.L.], v. 25, n. 5, p. 529-545, maio 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354\(91\)90126-b](http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(91)90126-b).

IBGE. Produção da Pecuária Municipal. Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2015. Disponível em:<
https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf>. Acesso em: 07 de dezembro de 2021.

IMMANUEL, Grasian; SIVAGNANAVELMURUGAN, Madasamy; MARUDHUPANDI, Thangapandi; RADHAKRISHNAN, Srinivasan; PALAVESAM, Arunachalam. The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). **Fish & Shellfish Immunology**, [S.L.], v. 32, n. 4, p. 551-564, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.01.003>.

JOFRE, J.; BOSCH, A.; LUCENA, F.; GIRONÉS, R.; TARTERA, C. Evaluation of *Bacteroides fragilis* Bacteriophages as Indicators of the Virological Quality of Water. **Water Science and Technology**, [S.L.], v. 18, n. 10, p. 167-173, 1 out. 1986. IWA Publishing. <http://dx.doi.org/10.2166/wst.1986.0126>.

JONES, Melissa K.; WATANABE, Makiko; ZHU, Shu; GRAVES, Christina L.; KEYES, Lisa R.; GRAU, Katrina R.; GONZALEZ-HERNANDEZ, Mariam B.; IOVINE, Nicole M.; WOBUS, Christiane E.; VINJÉ, Jan. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. **Science**, [S.L.], v. 346, n. 6210, p. 755-759, 7 nov. 2014. American

Association for the Advancement of Science (AAAS).
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1257147>.

JONES, Melissa K; GRAU, Katrina R; COSTANTINI, Veronica; KOLAWOLE, Abimbola O; GRAAF, Miranda de; FREIDEN, Pamela; GRAVES, Christina L; KOOPMANS, Marion; WALLET, Shannon M; A TIBBETTS, Scott. Human norovirus culture in B cells. **Nature Protocols**, [S.L.], v. 10, n. 12, p. 1939-1947, 29 out. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015.121>.

JOTHIKUMAR, N.; CROMEANS, T. L.; SOBSEY, M. D.; ROBERTSON, B. H. Development and Evaluation of a Broadly Reactive TaqMan Assay for Rapid Detection of Hepatitis A Virus. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 71, n. 6, p. 3359-3363, jun. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.71.6.3359-3363.2005>.

KARST, Stephanie M; ZHU, Shu; GOODFELLOW, Ian G. The molecular pathology of noroviruses. **The Journal of Pathology**, [S.L.], v. 235, n. 2, p. 206-216, 11 dez. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/path.4463>.

KATAYAMA, K.; MURAKAMI, K.; SHARP, T. M.; GUIX, S.; OKA, T.; TAKAI-TODAKA, R.; NAKANISHI, A.; CRAWFORD, S. E.; ATMAR, R. L.; ESTES, M. K. Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. **Proceedings Of the National Academy of Sciences**, [S.L.], v. 111, n. 38, p. 4043-4052, 5 set. 2014. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1415096111>.

KEIVAN, Z; MORADALI, Fouladv; PARISA, Pakdel; KOHZAD, Sartavi. Evaluation of in vitro antiviral activity of a brown alga (*Cystoseira myrica*) from the Persian Gulf against herpes simplex virus type 1. **African Journal Of Biotechnology**, [S.L.], v. 6, n. 22, p. 2511-2514, 19 nov. 2007. Academic Journals. <http://dx.doi.org/10.5897/ajb2007.000-2399>.

KINGSLEY, David H.; RICHARDS, Gary P. Rapid and Efficient Extraction Method for Reverse Transcription-PCR Detection of Hepatitis A and Norwalk-Like Viruses in Shellfish. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 67, n. 9, p. 4152-4157, set. 2001. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.67.9.4152-4157.2001>.

KINGSLEY, David H.; CHEN, Haiqiang; MEADE, Gloria K. Persistence of MS-2 Bacteriophage Within Eastern Oysters. **Food And Environmental Virology**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 83-88, 22 ago. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-017-9315-3>.

KIRK, Martyn D; ANGULO, Frederick J; HAVELAAR, Arie H; BLACK, Robert e. Diarrhoeal disease in children due to contaminated food. **Bulletin Of The World Health Organization**, [S.L.], v. 95, n. 3, p. 233-234, 25 nov. 2016. WHO Press. <http://dx.doi.org/10.2471/blt.16.173229>.

KOU, Xiaoxia; WU, Qingping; WANG, Dapeng; ZHANG, Jumei. Simultaneous detection of norovirus and rotavirus in oysters by multiplex RT-PCR. **Food Control**, [S.L.], v. 19, n. 7, p. 722-726, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.07.001>.

KRIENITZ, Lothar; WIRTH, Manfred. The high content of polyunsaturated fatty acids in *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae) and its implication for food web interactions, freshwater aquaculture and biotechnology. **Limnologia**, [S.L.], v. 36, n. 3, p. 204-210, set. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.limno.2006.05.002>.

KURĆUBIĆ, Vladimir S.; MAŁKOVIĆ, Pavle Z.; VUJIĆ, Jelena M.; VRANIĆ, Danijela V.; VESKOVIĆ-MORAČANIN, Slavica M.; OKANOVIĆ, Đorđe G.; LILIĆ, Slobodan V. Antioxidant and antimicrobial activity of *Kitaibelia vitifolia* extract as alternative to the added nitrite in fermented dry sausage. **Meat Science**, [S.L.], v. 97, n. 4, p. 459-467, ago. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.03.012>.

LANNA, Maria Célia da Silva; VIANCELLI, Aline; MICHELON, William; CARVALHO, Sergio Vinícius Castro; REIS, Deyse de Almeida dos; SALLES, Luiz Antônio Fernandez de; SANT'ANNA, Iago Hashimoto; RESENDE, Letícia Teresinha; FERREIRA, Clovis de Souza; CHAGAS, Igor Aparecido das. Household-based biodigesters promote reduction of enteric virus and bacteria in vulnerable and poverty rural area. **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 252, p. 8-13, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.104>.

LECHEVALLIER, Mark W.; KARIM, Mohammad R.; WEIHE, Janice; ROSEN, Jeffrey S.; JOSÉ SOBRINHO. Coliphage as a potential indicator of distribution system integrity. **Journal - American Water Works Association**, [S.L.], v. 98, n. 7, p. 87-96, jul. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/j.1551-8833.2006.tb07713.x>.

LEE, R; LOVATELLI, A; ABABOUC, L. Bivalve depuration: fundamental and practical aspects. Vol. 511, FAO Fisheries Technical Paper. Rome, Italy; 2008.

LEES, David. Viruses and bivalve shellfish. **International Journal of Food Microbiology**, [S.L.], v. 59, n. 1-2, p. 81-116, jul. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00248-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00248-8).

LEES, David. International Standardisation of a Method for Detection of Human Pathogenic Viruses in Molluscan Shellfish. **Food And Environmental Virology**, [S.L.], v. 2, n. 3, p. 146-155, 16 jun. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-010-9042-5>.

LEES, D; YOUNGER, A. & DORE, B. Depuration and Relaying. Safe Management of Shellfish and Harvest Areas, **WHO**, p. 145-181, 2010.

LEWIS, G D; METCALF, T G. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 54, n. 8, p. 1983-1988, ago. 1988. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.54.8.1983-1988.1988>.

LI, Jianrong; PREDMORE, Ashley; DIVERS, Erin; LOU, Fangfei. New Interventions Against Human Norovirus: progress, opportunities, and challenges. **Annual Review Of Food Science And Technology**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 331-352, 10 abr. 2012. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101234>.

LINDESMITH, Lisa; MOE, Christine; MARIONNEAU, Severine; RUVOEN, Nathalie; JIANG, XI; LINDBLAD, Lauren; STEWART, Paul; LEPENDU, Jacques; BARIC, Ralph. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 548-553, 14 abr. 2003. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm860>.

LINGHAM, Talaysha; YE, Mu; CHEN, Haiqiang; CHINTAPENTA, Lathadevi Karuna; HANDY, Eunice; ZHAO, Jing; WU, Changqing; OZBAY, Gulnihal. Effects of High Hydrostatic Pressure on the Physical, Microbial, and Chemical Attributes of Oysters (*Crassostrea virginica*). **Journal Of Food Science**, [S.L.], v. 81, n. 5, p. 1158-1166, 13 abr. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.13290>.

LIRA, Ana Luiza; VESOLOSKI, Josieli Fátima; PERUZZOLO, Marcieli; FLÔRES, Débora Zamproga; CANSIAN, Rogério L.; PAROUL, Natalia. Atividades antioxidante, antimicrobiana e compostos fenólicos de extratos comercial e in natura de *Curcuma longa*. **Revista Perspectiva**, [S.L.], v. 45, n. 169, p. 107-114, 18 maio 2021. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missoes. <http://dx.doi.org/10.31512/persp.v.45.n.169.2021.146.p.107-114>.

LIU, Qing; MENG, Xiao; LI, Ya; ZHAO, Cai-Ning; TANG, Guo-Yi; LI, Hua-Bin. Antibacterial and Antifungal Activities of Spices. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 18, n. 6, p. 1283, 16 jun. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18061283>.

EKALOU, Pavel; NĚMCOVÁ, Yvonne; PYTELA, Jaromír; BOGDANOV, Nikolay I.; BOCK, Christina; PICKINPAUGH, Sam H. *Planktochlorella nurekis* gen. et sp. nov. (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*), a novel coccoid green alga carrying significant biotechnological potential. **Fottea**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 53-62, 1 mar. 2014. Palacky University Olomouc. <http://dx.doi.org/10.5507/fot.2014.004>.

LOPMAN, Ben; VENNEMA, Harry; KOHLI, Evelyne; POTHIER, Pierre; SANCHEZ, Alicia; NEGREDO, Anabel; BUESA, Javier; SCHREIER, Eckart; GRAY, Jim; GALLIMORE, Chris. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. **The Lancet**, [S.L.], v. 363, n. 9410, p. 682-688, fev. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)15641-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(04)15641-9).

LOURENÇO, Sergio O.; MARQUEZ, Ursula M. Lanfer; MANCINI-FILHO, Jorge; BARBARINO, Elisabete; AIDAR, Elizabeth. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparison of two culture media. **Aquaculture**, [S.L.], v. 148, n. 2-3, p. 153-168, jan. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486\(96\)01416-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486(96)01416-0).

LOURY, P.; GUYADER, F. S. Le; SAUX, J. C. Le; AMBERT-BALAY, K.; PARROT, P.; HUBERT, B. A norovirus oyster-related outbreak in a nursing home in France, January

2012. **Epidemiology And Infection**, [S.L.], v. 143, n. 12, p. 2486-2493, 8 jan. 2015. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0950268814003628>.

LOWMOUNG, Taruta; POMBUBPA, Kannika; DUANGDEE, Teerapong; TIPAYAMONGKHOLGUL, Mathuros; KITTIGUL, Leera. Distribution of Naturally Occurring Norovirus Genogroups I, II, and IV in Oyster Tissues. **Food And Environmental Virology**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 415-422, 26 maio 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-017-9305-5>.

LOWTHER, James A.; GUSTAR, Nicole E.; POWELL, Andrew L.; HARTNELL, Rachel E.; LEES, David N. Two-Year Systematic Study To Assess Norovirus Contamination in Oysters from Commercial Harvesting Areas in the United Kingdom. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 78, n. 16, p. 5812-5817, 15 ago. 2012. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01046-12>.

LOWTHER, J. A.; CROSS, L.; STAPLETON, T.; GUSTAR, N. E.; WALKER, D. I.; SILLS, M.; TREAGUS, S.; POLLINGTON, V.; LEES, D. N. Use of F-Specific RNA Bacteriophage to Estimate Infectious Norovirus Levels in Oysters. **Food And Environmental Virology**, [S.L.], v. 11, n. 3, p. 247-258, 21 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-019-09383-3>.

LUKJANCENKO, O., Wassenaar, TM & Ussery, DW Comparação de 61 genomas sequenciados de *Escherichia coli*. *Microb. Eco* **60**, 708-720 (2010).

LURIA, S. E. Bacteriophage: an essay on virus reproduction. **Science**, [S.L.], v. 111, n. 2889, p. 507-511, 12 maio 1950. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.111.2889.507>.

MAALOUF, Haifa; ZAKHOUR, Maha; PENDU, Jacques Le; SAUX, Jean-Claude Le; ATMAR, Robert L.; GUYADER, Françoise S. Le. Distribution in Tissue and Seasonal Variation of Norovirus Genogroup I and II Ligands in Oysters. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 76, n. 16, p. 5621-5630, 15 ago. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.00148-10>.

MACHADO, A.R.; RODRIGUES, R.S.; MACHADO, M.R.G. & SOUZA-SOARES, L.A. (2014) -Influência da *Spirulina* LEB-18 em tamanho nanométrico no metabolismo de ratos fêmeas Wistar. *Revista de Ciências Agrárias*, vol. 37, n. 1, p. 29-36.

MAILLARD, J.-Y.; BEGGS, T. S.; DAY, M. J.; HUDSON, R. A.; RUSSELL, A. D. Effect of Biocides on MS2 and K Coliphages. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 60, n. 6, p. 2205-2206, jun. 1994. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.60.6.2205-2206.1994>.

MAITHILIKARPAGASELVI, Nachimuthu; SRIDHAR, Magadi Gopalakrishna; SWAMINATHAN, Rathinam Palamalai; SRIPRADHA, Ramalingam; BADHE, Bhawana. Curcumin inhibits hyperlipidemia and hepatic fat accumulation in high-fructose-fed male Wistar rats. **Pharmaceutical Biology**, [S.L.], v. 54, n. 12, p. 2857-2863, 30 maio 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2016.1187179>.

MARIONNEAU, Severine ; RUVOËN, Nathalie ; MOULLAC-VAIDYE, Beatrice Le ; CLEMENT, Monique ; CAILLEAU-THOMAS, Anne ; RUIZ-PALACOIS, Guillermo ; HUANG, Pengwei ; JIANG, XI ; PENDU, Jacques Le. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. **Gastroenterology**, [S.L.], v. 122, n. 7, p. 1967-1977, jun. 2002. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/gast.2002.33661>.

MARTELLI, Giulia; FOLLI, Claudia; VISAI, Livia; DAGLIA, Maria; FERRARI, Davide. Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 154-159, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.10.008>.

MASHJOOR, Sakineh; YOUSEFZADI, Morteza; ESMAEILI, Mohamad Ali; RAFIEE, Roya. Cytotoxicity and antimicrobial activity of marine macro algae (*Dictyotaceae* and *Ulvaceae*) from the Persian Gulf. **Cytotechnology**, [S.L.], v. 68, n. 5, p. 1717-1726, 27 out. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10616-015-9921-6>.

MASON, James O.; MCLEAN, Willbert R. Infectious hepatitis traced to the consumption of raw oysters. **American Journal Of Epidemiology**, [S.L.], v. 75, n. 1, p. 90-111, jan. 1962. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a120238>.

MAU, Jeng-Leun; CHEN, Chiu-Ping; HSIEH, Pao-Chuan. Antimicrobial Effect of Extracts from Chinese Chive, Cinnamon, and Corni Fructus. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 183-188, 9 dez. 2000. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf000263c>.

MCFADDEN, Nora; BAILEY, Dalan; CARRARA, Guia; BENSON, Alicia; CHAUDHRY, Yasmin; SHORTLAND, Amita; HEENEY, Jonathan; YAROVINSKY, Felix; SIMMONDS, Peter; MACDONALD, Andrew. Norovirus Regulation of the Innate Immune Response and Apoptosis Occurs via the Product of the Alternative Open Reading Frame 4. **Plos Pathogens**, [S.L.], v. 7, n. 12, p. 1002413, 8 dez. 2011. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002413>.

MCLEOD, C.; HAY, B.; GRANT, C.; GREENING, G.; DAY, D. Localization of norovirus and poliovirus in Pacific oysters. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 106, n. 4, p. 1220-1230, abr. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04091.x>.

MCLEOD, Catherine ; POLO, David ; SAUX, Jean-Claude Le ; GUYADER, Françoise S. Le. Depuration and Relaying: a review on potential removal of norovirus from oysters. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 692-706, 8 jun. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12271>.

MCMINN, B.R.; ASHBOLT, N.J.; KORAJKIC, A. Bacteriophages as indicators of faecal pollution and enteric virus removal. **Letters In Applied Microbiology**, [S.L.], v. 65, n. 1, p. 11-26, 5 jun. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/lam.12736>.

MESQUITA, João R.; VAZ, Lisa; CERQUEIRA, Sónia; CASTILHO, Fernanda; SANTOS, Ricardo; MONTEIRO, Sílvia; MANSO, Carmen F.; ROMALDE, Jesus L.; NASCIMENTO,

Maria São José. Norovirus, hepatitis A virus and enterovirus presence in shellfish from high quality harvesting areas in Portugal. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 28, n. 5, p. 936-941, 8 jun. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.01.005>.

METCALF, T. G.; MELNICK, J. L.; ESTES, M. K. Environmental Virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology.: a trip of over 50 years. **Annual Review of Microbiology**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 461-487, out. 1995. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.002333>. 21-27, 1982.

MICHELON, William; ZUCHI, Isabella Dai Pra; REIS, Jacqueline Graff; MATTHIENSEN, Alexandre; VIANCELLI, Aline; CRUZ, Ariadne Cristiane Cabral da; SILVA, Izabella Thaís; FONGARO, Gislaine; SOARES, Hugo Moreira. Virucidal activity of microalgae extracts harvested during phycoremediation of swine wastewater. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 29, n. 19, p. 28565-28571, 6 jan. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-021-17912-6>.

MIOTTO, M. Recomendações para um programa de Boas Práticas de Fabricação aquícolas em cultivos de ostras (*Crassostrea gigas*). 2012, 152 f. Dissertação (mestrado em ciência dos alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MONTALVÃO, Sofia; DEMIREL, Zeliha; DEVI, Prabha; LOMBARDI, Valter; HONGISTO, Vesa; PERÄLÄ, Merja; HATTARA, Johannes; IMAMOGLU, Esra; TILVI, Supriya Shet; TURAN, Gamze. Large-scale bioprospecting of cyanobacteria, micro- and macroalgae from the Aegean Sea. **New Biotechnology**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 399-406, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2016.02.002>.

MORETTO, Eliane; FETT, Roseane; GONZAGA, Luciano V.; KUSKOSKI, Eugênia Marta. **Introdução à Ciência de Alimentos**. Florianópolis: Editora da UFSC. 255p. 2002.

MORITA, Tokio; ASSUMPÇÃO, Rosely M.V. **Manual de Soluções, Reagentes & Solventes – Padronização, Preparação e Purificação**. São Paulo: Ed. Edgar Blücher. 1972. 629p.

MUN, Su-Hyun; JOUNG, Dae-Ki; KIM, Yong-Sik; KANG, Ok-Hwa; KIM, Sung-Bae; SEO, Yun-Soo; KIM, Youn-Chul; LEE, Dong-Sung; SHIN, Dong-Won; KWEON, Kee-Tae. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytomedicine**, [S.L.], v. 20, n. 8-9, p. 714-718, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2013.02.006>.

MURPHY, A. M.; GROHMANN, G. S.; CHRISTOPHER, P. J.; LOPEZ, W. A.; DAVEY, G. R.; MILLSOM, R. H. An Australia-wide outbreak of gastroenteritis from oysters caused by norwalk virus. **Medical Journal Of Australia**, [S.L.], v. 2, n. 7, p. 329-333, out. 1979. AMPCo. <http://dx.doi.org/10.5694/j.1326-5377.1979.tb104133.x>.

NAIR, K. P. P. The Agronomy and Economy of Turmeric and Ginger. **Newnes**, [S.L.], p. 1-5, 2013. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/c2011-0-07514-2>.

NAPPIER, Sharon P.; GRACZYK, Thaddeus K.; SCHWAB, Kellogg J. Bioaccumulation, Retention, and Depuration of Enteric Viruses by *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis* Oysters. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 74, n. 22, p. 6825-6831, 15 nov. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01000-08>.

NAPPIER, S.P.; GRACZYK, T.K.; TAMANG, L.; SCHWAB, K.J. Co-localized *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis* Oysters differ in bioaccumulation, retention and depuration of microbial indicators and human enteropathogens. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 108, n. 2, p. 736-744, fev. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04480.x>.

NETO, R. M.; Influência de Variáveis Ambientais Sobre o Desenvolvimento de Ostras *Crassostrea* (Sacco, 1897) na Baía de Guaratuba, Brasil. Curitiba-PR, 2011. 64p. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Paraná.

NGAZOA, E.s.; FLISS, I.; JEAN, J. Quantitative study of persistence of human norovirus genome in water using TaqMan real-time RT-PCR. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 104, n. 3, p. 707-715, mar. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03597.x>.

NOLKEMPER, Silke; REICHLING, Jürgen; STINTZING, Florian; CARLE, Reinhold; SCHNITZLER, Paul. Antiviral Effect of Aqueous Extracts from Species of the Lamiaceae Family against *Herpes simplex* Virus Type 1 and Type 2 in vitro. **Planta Medica**, [S.L.], v. 72, n. 15, p. 1378-1382, dez. 2006. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-951719>.

NSSP, 2017. National Shellfish Sanitation Program (NSSP) Guide for the Control of Molluscan Shellfish 2017 Revision.

OMS/UNICEF. Progress on Drinking Water, Sanitation and Hygiene. Geneva, 2017.

ORBAN, Elena; LENA, Gabriella di; MASCI, Maurizio; NEVIGATO, Teresina; CASINI, Irene; CAPRONI, Roberto; GAMBELLI, Loretta; PELLIZZATO, Michele. Growth, nutritional quality and safety of oysters (*Crassostrea gigas*) cultured in the lagoon of Venice (Italy). **Journal Of the Science of Food and Agriculture**, [S.L.], v. 84, n. 14, p. 1929-1938, 7 out. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.1896>.

OSORIO-TOBÓN, J. Felipe; CARVALHO, Pedro I.N.; ROSTAGNO, Mauricio A.; PETENATE, Ademir J.; MEIRELES, M. Angela A. Extraction of curcuminoids from deflavored turmeric (*Curcuma longa* L.) using pressurized liquids: process integration and economic evaluation. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S.L.], v. 95, p. 167-174, nov. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2014.08.012>.

PARISENTI, Jane; TRAMONTE, Vera Lúcia Cardoso Garcia; ARELLANO, Daniel Barrera. Composição de esteróis e ácidos graxos de ostras (*Crassostrea gigas*) cultivadas em Florianópolis - SC, em duas estações do ano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [S.L.], v.

30, p. 73-76, maio 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612010000500012>.

PARISI, A.S.; YOUNES, S.; REINEHR, C.O & COLLA, L.M. (2009) – Avaliação da atividade antibacteriana da microalga *Spirulina platensis*. *Revista Ciências Farmacêuticas, básica e Aplicada*, vol. 30, n. 3, p. 297-301.

PARRÓN, I.; ÁLVAREZ, J.; JANÉ, M.; SÁNCHEZ, T. Cornejo; RAZQUIN, E.; GUIX, S.; CAMPS, G.; PÉREZ, C.; DOMÍNGUEZ, À.. A foodborne norovirus outbreak in a nursing home and spread to staff and their household contacts. **Epidemiology And Infection**, [S.L.], v. 147, jun. 2019. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0950268819001146>.

PARVATHY, K.s.; NEGI, P.s.; SRINIVAS, P. Antioxidant, antimutagenic and antibacterial activities of curcumin- β -diglucoside. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 115, n. 1, p. 265-271, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.036>.

PAZ-Y-MIÑO, Marco; BARZOLA, Carmen; LAZCANO, César; PONCE, Milagros; LEÓN, Jorge. Colifagos como indicadores de contaminación fecal y de remoción bacteriana en la potabilización del agua. **Revista Peruana de Biología**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 133-144, 10 jun. 2013. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Vicerectorado de Investigación. <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v10i2.2495>.

PEDROSA, Lucia de Fátima Campos; COZZOLINO, Silvia Maria Franciscato. Composição centesimal e de minerais de mariscos crus e cozidos da cidade de Natal/RN. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 154-157, ago. 2001. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612001000200006>.

PEDROSO, M.Z.; FRANÇA, J.P.; RODRIGUES, P.F.; SANTOS, A.; JÚNIOR, O.C. Uma síntese sobre colifagos como indicadores de poluição fecal. *Revista O Mundo da Saúde*, São Paulo, SP, v.27, n.4, p.559-563. 2003.

PERUMALLA, A.V.s.; HETTIARACHCHY, Navam. S. Green tea and grape seed extracts — Potential applications in food safety and quality. **Food Research International**, [S.L.], v. 44, n. 4, p. 827-839, maio 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.022>.

PILOTTO, M. R. **Aquisição, estabilidade e inativação de vírus entéricos em ostras *Crassostrea gigas***. (Mestre em Biotecnologia e Biociências). Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia e Biociências. Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

PILOTTO, Mariana Rangel; SOUZA, Doris Sobral Marques; BARARDI, Célia Regina Monte. Viral uptake and stability in *Crassostrea gigas* oysters during depuration, storage and steaming. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 149, p. 110524, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110524>.

POIREL, Laurent ; MADEC, Jean-Yves ; LUPO, Agnese ; SCHINK, Anne-Kathrin ; KIEFFER, Nicolas ; NORDMANN, Patrice ; SCHWARZ, Stefan. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 1-27, 27 jul. 2018. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017>.

PORTELLA, C. D. G. Avaliação da qualidade da ostra nativa *Crassostrea brasiliana* congelada em concha em função da composição química e análise sensorial. 2005, 66 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

PRASAD, B. V. V.; HARDY, Michele E.; DOKLAND, Terje; BELLA, Jordi; ROSSMANN, Michael G.; ESTES, Mary K. X-ray Crystallographic Structure of the Norwalk Virus Capsid. **Science**, [S.L.], v. 286, n. 5438, p. 287-290, 8 out. 1999. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.286.5438.287>.

PRESTINACI, Francesca; PEZZOTTI, Patrizio; PANTOSTI, Annalisa. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. **Pathogens And Global Health**, [S.L.], v. 109, n. 7, p. 309-318, 7 set. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1179/2047773215y.0000000030>.

PROVOST, Keleigh; DANCHO, Brooke A.; OZBAY, Gulnihal; ANDERSON, Robert S.; RICHARDS, Gary P.; KINGSLEY, David H. Hemocytes Are Sites of Enteric Virus Persistence within Oysters. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 77, n. 23, p. 8360-8369, dez. 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.06887-11>.

RAI, Dipti; SINGH, Jay Kumar; ROY, Nilanjan; PANDA, Dulal. Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. **Biochemical Journal**, [S.L.], v. 410, n. 1, p. 147-155, 29 jan. 2008. Portland Press Ltd. <http://dx.doi.org/10.1042/bj20070891>.

RAMOS, R. J. Monitoramento bacteriológico de águas do mar e ostras (*Crassostrea gigas*) em áreas de cultivo na baía Sul da Ilha de Santa Catarina. 2007, 86f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RAVINDRAN, P.; BABU, K. N.; SIVARAMAN, K. Turmeric: The genus *Curcuma*, Boca Raton, Taylor & Francis. [S.L.], p. 1-504, 1 mar. 2007. CRC Press. <http://dx.doi.org/10.1201/9781420006322>.

REED, L.J.; Muench, h. a simple method of estimating fifty per cent endpoints¹². **American Journal of Epidemiology**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 493-497, maio 1938. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>.

REGULAMENTO (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004 que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. Jornal Oficial da União Europeia L 139 de 30/4/2004.

REGULAMENTO (CE) n.º 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004 que estabelece regras específicas de organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano. Jornal Oficial da União Europeia L 139 de 30/4/2004.

REYMAÃO, Tammy Kathlyn Amaral; FUMIAN, Tulio Machado; JUSTINO, Maria Cleonice Aguiar; HERNANDEZ, Juliana Mercedes; BANDEIRA, Renato Silva; LUCENA, Maria Silvia Sousa; TEIXEIRA, Dielle Monteiro; FARIAS, Fredison Pinheiro; SILVA, Luciana Damascena; LINHARES, Alexandre Costa. Norovirus RNA in serum associated with increased fecal viral load in children: detection, quantification and molecular analysis. **Plos One**, [S.L.], v. 13, n. 7, p. 0199763, 2 jul. 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0199763>.

REYNOLDS, K. A. Coliphage: a better water quality indicator. *Water Conditioning and Purification*, v. 48, n. 9, EUA, set. 2006.

RIGOTTO, C.; SINCERO, T.C.M.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M. Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional-PCR, nested-PCR, and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). **Water Research**, [S.L.], v. 39, n. 2-3, p. 297-304, jan. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2004.10.005>.

RIGOTTO, C.; VICTORIA, M.; MORESCO, V.; KOLESNIKOVAS, C.K.; CORRÊA, A.A.; SOUZA, D.s.M.; MIAGOSTOVICH, M.P.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianopolis, South Brazil. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 109, n. 6, p. 1979-1987, 12 nov. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04827.x>.

RIGOTTO, C.; HANLEY, K.; ROCHELLE, P.A.; LEON, R. de; BARARDI, C.R.M.; YATES, M.V. Survival of Adenovirus Types 2 and 41 in Surface and Ground Waters Measured by a Plaque Assay. **Environmental Science & Technology**, [S.L.], v. 45, n. 9, p. 4145-4150, 11 abr. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/es103922r>.

RITTENSCHÖBER, Doris; NOWAK, Verena; CHARRONDIÈRE, U. Ruth. Review of availability of food composition data for fish and shellfish. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 141, n. 4, p. 4303-4310, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.007>.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, David; COOK, Nigel; RUGGERI, Franco M.; SELLWOOD, Jane; NASSER, Abid; NASCIMENTO, Maria São Jose; D'AGOSTINO, Martin; SANTOS, Ricardo; SAIZ, Juan Carlos; RZESÛTKA, Artur. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 36, n. 4, p. 786-814, jul. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00306.x>.

ROHWER, Forest. Global Phage Diversity. **Cell**, [S.L.], v. 113, n. 2, p. 141, abr. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00276-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00276-9).

ROMALDE, J L; ESTES, M K; SZÛCS, G; ATMAR, R L; WOODLEY, C M; METCALF, T G. In situ detection of hepatitis, A virus in cell cultures and shellfish tissues. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 60, n. 6, p. 1921-1926, jun. 1994. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.60.6.1921-1926.1994>.

ROSA, Gonçalo P.; TAVARES, Wilson R.; SOUSA, Pedro M. C.; PAGÈS, Aida K.; SECA, Ana M. L.; PINTO, Diana C. G. A. Seaweed Secondary Metabolites with Beneficial Health Effects: an overview of successes in in vivo studies and clinical trials. **Marine Drugs**, [S.L.],

v. 18, n. 1, p. 8, 20 dez. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md18010008>.

RUPPERT, E. & BARNES, R.D. 1996. Zoologia dos Invertebrados. 6ª ed., Roca Ed., São Paulo. 1029 p.

SAE-LEAW, Thanasak; BENJAKUL, Soottawat. Prevention of melanosis in crustaceans by plant polyphenols: a review. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 85, p. 1-9, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2018.12.003>.

SANTOS, Norma Sueli de Oliveira; ROMANOS, Maria Teresa Villela; WIGG, Marcia Dutra. Virologia Humana. Terceira edição. Editora Guanabara Koogan Ltda, Rio de Janeiro, 2015.

SCHULTZ, Anna Charlotte; SAADBYE, Peter; HOORFAR, Jeffrey; NØRRUNG, Birgit. Comparison of methods for detection of norovirus in oysters. **International Journal of Food Microbiology**, [S.L.], v. 114, n. 3, p. 352-356, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.028>.

SCHWAB, Kellogg J.; NEILL, Frederick H.; ESTES, Mary K.; METCALF, Theodore G.; ATMAR, Robert L. Distribution of Norwalk Virus within Shellfish Following Bioaccumulation and Subsequent Depuration by Detection Using RT-PCR. **Journal Of Food Protection**, [S.L.], v. 61, n. 12, p. 1674-1680, 1 dez. 1998. International Association for Food Protection. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x-61.12.1674>.

SHIM, J.; STEWART, D. S.; NIKOLOV, A. D.; WASAN, D. T.; WANG, R.; YAN, R.; SHIEH, Y. C. Differential MS2 Interaction with Food Contact Surfaces Determined by Atomic Force Microscopy and Virus Recovery. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 83, n. 24, 15 dez. 2017. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01881-17>.

SHIN, Gwy-Am; SOBSEY, Mark D. Reduction of Norwalk Virus, Poliovirus 1, and Bacteriophage MS2 by Ozone Disinfection of Water. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 69, n. 7, p. 3975-3978, jul. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.69.7.3975-3978.2003>.

SILVA, Thauane; SALOMON, Paulo S.; HAMERSKI, Lidilhone; WALTER, Juline; MENEZES, Rafael B.; SIQUEIRA, José Edson; SANTOS, Aline; SANTOS, Jéssica Aparecida Morais; FERME, Natália; GUIMARÃES, Thaise. Inhibitory effect of microalgae and cyanobacteria extracts on influenza virus replication and neuraminidase activity. **PeerJ**, [S.L.], v. 6, p. 5716, 26 out. 2018. PeerJ. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.5716>.

SINGH, R.; CHANDRA, R.; BOSE, M.; LUTHRA, P. M. Antibacterial activity of *Curcuma longa* rhizome extract on pathogenic bacteria. *Current Science*, Bangalore, v. 83, n. 6, p. 737-740, 2002.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphos photungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SIVAGNANAVELMURUGAN, Madasamy; MARUDHUPANDI, Thangapandi; PALAVESAM, Arunachalam; IMMANUEL, Grasian. Antiviral Effect of Fucoidan Extracted from the Brown Seaweed, *Sargassum wightii*, on Shrimp *Penaeus monodon* Postlarvae against White Spot Syndrome Virus. **Journal Of The World Aquaculture Society**, [S.L.], v. 43, n. 5, p. 697-706, out. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-7345.2012.00596.x>.

SOARES, Lucia Valente. **Curso básico de Instrumentação para Analistas de Alimentos e Fármacos**. São Paulo: Editora Manole. 337p. 2006.

SOARES, L. S. Estudo da absorção e dessorção de CO₂ em ostras (*Crassostrea gigas*) durante a pré-solubilização. 79 p. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

SOLEIMANI, Vahid; SAHEBKAR, Amirhossein; HOSSEINZADEH, Hossein. Turmeric (*Curcuma longa*) and its major constituent (curcumin) as nontoxic and safe substances: review. **Phytotherapy Research**, [S.L.], v. 32, n. 6, p. 985-995, 26 fev. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.6054>.

SOLIS-SANCHEZ, Diana; RIVERA-PIZA, Adriana; LEE, Soyung; KIM, Jia; KIM, Bomi; CHOI, Joo Bong; KIM, Ye Won; KO, Gwang Pyo; SONG, Moon Jung; LEE, Sung-Joon. Antiviral Effects of *Lindera obtusiloba* Leaf Extract on Murine Norovirus-1 (MNV-1), a Human Norovirus Surrogate, and Potential Application to Model Foods. **Antibiotics**, [S.L.], v. 9, n. 10, p. 697, 14 out. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics9100697>.

SOMARATHNA, T.; FERNANDO, W.M.A.D.B.; RANAWEERA, K.K.D.s.; PREMAKUMARA, G.A.s.; ABEYSINGHE, T.; WEERAKKODY, N.s. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Alpinia malaccensis* (Ran-kiriya) against food-borne bacteria. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 125, n. 5, p. 1276-1285, 16 ago. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.14039>.

SOUZA, Doris Sobral Marques; PIAZZA, Rômi Sharon; PILOTTO, Mariana Rangel; NASCIMENTO, Mariana de Almeida do; MORESCO, Vanessa; TANIGUCHI, Satie; LEAL, Diego Averaldo Guiguet; SCHMIDT, Éder Carlos; CARGIN-FERREIRA, Eduardo; BÍCEGO, Márcia Caruso. Virus, protozoa and organic compounds decay in depurated oysters. **International Journal of Food Microbiology**, [S.L.], v. 167, n. 3, p. 337-345, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.019>.

SOUZA, Doris Sobral Marques. **Aquisição e Eliminação de Contaminantes em Tecidos de Moluscos Bivalves**. (Doutorado em Biotecnologia e Biociências). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

SOUZA, Doris Sobral Marques; DOMINOT, Ana Ferreira Ávila; MORESCO, Vanessa; BARARDI, Célia Regina Monte. Presence of enteric viruses, bioaccumulation and stability in *Anomalocardia brasiliana* clams (Gmelin, 1791). **International Journal Of Food Microbiology**, [S.L.], v. 266, p. 363-371, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.08.004>.

STAFFORD, R (1997). An outbreak of norwalk virus gastroenteritis following consumption of oysters. *Communicable Diseases Intelligence*, [S.I.], v. 21, n. 21, p. 1-5.

STROFFOLINI, T.; BIAGINI, W.; LORENZONI, L.; PALAZZESI, G. P.; DIVIZIA, M.; FRONGILLO, R. An outbreak of hepatitis a in young adults in central Italy. **European Journal Of Epidemiology**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 156-159, jun. 1990. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00145788>.

SU, Xiaowei; HOWELL, Amy B.; D'SOUZA, Doris H. Antiviral effects of cranberry juice and *cranberry proanthocyanidins* on foodborne viral surrogates – A time dependence study in vitro. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 27, n. 8, p. 985-991, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.027>.

SUPPAKUL, Panuwat; THANATHAMMATHORN, Thitiporn; SAMERASUT, Ornsiri; KHANKAEW, Surachai. Shelf life extension of “fios de ovos”, an intermediate-moisture egg-based dessert, by active and modified atmosphere packaging. **Food Control**, [S.L.], v. 70, p. 58-63, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.036>.

TEUNIS, P. F. M.; SUKHRIE, F. H. A.; VENNEMA, H.; BOGERMAN, J.; BEERSMA, M. F. C.; KOOPMANS, M. P. G. Shedding of norovirus in symptomatic and asymptomatic infections. **Epidemiology And Infection**, [S.L.], v. 143, n. 8, p. 1710-1717, 22 out. 2014. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s095026881400274x>.

TIAN, Peng; ENGELBREKTSON, Anna L.; JIANG, XI; ZHONG, Weiming; MANDRELL, Robert E. Norovirus Recognizes Histo-Blood Group Antigens on Gastrointestinal Cells of Clams, Mussels, and Oysters: a possible mechanism of bioaccumulation. **Journal Of Food Protection**, [S.L.], v. 70, n. 9, p. 2140-2147, 1 set. 2007. International Association for Food Protection. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x-70.9.2140>.

TOCHER, D.R.; MOURENTE, G.; EECKEN, A. van Der; EVJEMO, J.O.; DIAZ, E.; BELL, J. G.; GEURDEN, I.; LAVENS, P.; OLSEN, Y. Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximusL.*), halibut (*Hippoglossus hippoglossusL.*) and sea bream (*Sparus aurataL.*). **Aquaculture Nutrition**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 195-207, 22 ago. 2002. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2095.2002.00205.x>.

TØNNESEN, Hanne Hjorth; VRIES, Henk de; KARLSEN, Jan; VAN HENEGOUWEN, Gerard Beijersbergen. Studies on Curcumin and Curcuminoids IX: investigation of the photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 76, n. 5, p. 371-373, maio 1987. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600760506>.

TONON, Thierry; HARVEY, David; LARSON, Tony R.; GRAHAM, Ian A. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 61, n. 1, p. 15-24, set. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00201-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00201-7).

TOUCHON, Marie ; HOEDE, Claire ; TENAILLON, Olivier ; BARBE, Valérie ; BAERISWYL, Simon ; BIDET, Philippe ; BINGEN, Edouard ; BONACORSI, Stéphane ;

- BOUCHIER, Christiane ; BOUVET, Odile. Organised Genome Dynamics in the *Escherichia coli* Species Results in Highly Diverse Adaptive Paths. **Plos Genetics**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1000344, 23 jan. 2009. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000344>.
- TOUCHON, M. *et al.* O contexto filogenético e o habitat impulsionam a diversificação genética da *Escherichia coli*. *PLoS Genet.* **16**, e1008866 (2020).
- TUFENKJI, N.; EMELKO, M.B. Fate and Transport of Microbial Contaminants in Groundwater. **Encyclopedia Of Environmental Health**, [S.L.], p. 715-726, 2011. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-444-52272-6.00040-4>.
- VAKILI, S.; ARDAKANI, S. A. Y. Antioxidant effect of orange peel extract on chemical quality, sensory properties, and black spots of farmed white shrimp. *Journal of Nutrition and Food Security*, v. 3, n. 1, p. 19–26, 2018.
- VAUGHN, Alexandra R.; BRANUM, Amy; SIVAMANI, Raja K. Effects of Turmeric (*Curcuma longa*) on Skin Health: a systematic review of the clinical evidence. **Phytotherapy Research**, [S.L.], v. 30, n. 8, p. 1243-1264, 23 maio 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.5640>.
- VAZ, Bruna da Silva; MOREIRA, Juliana Botelho; MORAIS, Michele Greque de; COSTA, Jorge Alberto Vieira. Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. **Current Opinion In Food Science**, [S.L.], v. 7, p. 73-77, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2015.12.006>.
- VICTORIA, M.; RIGOTTO, C.; MORESCO, V.; CORRÊA, A. de Abreu; KOLESNIKOVAS, C.; LEITE, J.P.G.; MIAGOSTOVICH, M.P.; BARARDI, C.R.M. Assessment of norovirus contamination in environmental samples from Florianópolis City, Southern Brazil. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 109, n. 1, p. 231-238, 10 jun. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04646.x>.
- WANG, Wei; WANG, Shi-Xin; GUAN, Hua-Shi. The Antiviral Activities and Mechanisms of Marine Polysaccharides: an overview. **Marine Drugs**, [S.L.], v. 10, n. 12, p. 2795-2816, 12 dez. 2012. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md10122795>.
- WANG, Shuyao; WANG, Wei; HAO, Cui; YUNJIA, Yu; QIN, Ling; HE, Meijia; MAO, Wenjun. Antiviral activity against enterovirus 71 of sulfated rhamnan isolated from the green alga *Monostroma latissimum*. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 200, p. 43-53, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.067>.
- WESTRELL, T; DUSCH, V; ETHELBERG, S; HARRIS, J; HJERTQVIST, M; SILVA, N Jourdan-Da; A KOLLER; A LENGLET; LISBY, M; VOLD, L. Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010. **Eurosurveillance**, [S.L.], v. 15, n. 12, p. 19524-19528, 25 mar. 2010. European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC). <http://dx.doi.org/10.2807/ese.15.12.19524-en>.
- WITHEY, S.; CARTMELL, E.; AVERY, L.M.; STEPHENSON, T. Bacteriophages—potential for application in wastewater treatment processes. **Science Of the Total**

Environment, [S.L.], v. 339, n. 1-3, p. 1-18, mar. 2005. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.09.021>.

WU, Juan; HOU, Wei; CAO, Binbin; ZUO, Tao; XUE, Changhu; LEUNG, Albert Wingnan; XU, Chuanshan; TANG, Qing-Juan. Virucidal efficacy of treatment with photodynamically activated curcumin on murine norovirus bio-accumulated in oysters. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 385-392, set. 2015. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.06.005>.

YANG, Ning; QI, Huizhou; WONG, Minnie Man Lai; WU, Rudolf Shiu Sun; KONG, Richard Yuen Chong. Prevalence and diversity of norovirus genogroups I and II in Hong Kong marine waters and detection by real-time PCR. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 64, n. 1, p. 164-168, jan. 2012. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.10.037>.

ZAKHOUR, M; MAALOUF, H; DI BARTOLO, I; HAUGARREAU, L; LE GUYADER, F. S. Ruvoen-Clouet N, Le Saux JC, Ruggeri FM, Pommepuy M, Le Pendu J. 2010. Ligante de norovírus bovino, contaminação ambiental e potencial transmissão entre espécies através da ostra. *Appl Environ Microbiol* 76:6404–6411.

ZHANG, X. F.; CHEN, J. R.; SONG, C. L.; XIE, D. J.; TAN, M.; WANG, L.; KOROMA, M. M.; HOU, Y. Z.; DONG, Z. P.; YU, J. R. Characterization of a hospital-based gastroenteritis outbreak caused by GII.6 norovirus in Jinshan, China. **Epidemiology And Infection**, [S.L.], v. 148, p. 1-9, 2020. Cambridge University Press (CUP).
<http://dx.doi.org/10.1017/s0950268820002538>.

ZITTELLI, G. Chini; LAVISTA, F.; BASTIANINI, A.; RODOLFI, L.; VINCENZINI, M.; TREDICI, M.R. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis sp.* cultures in outdoor tubular photobioreactors. **Journal Of Biotechnology**, [S.L.], v. 70, n. 1-3, p. 299-312, abr. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656\(99\)00082-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656(99)00082-6).

9. APÊNDICE 1 – MATERIAIS COMPLEMENTARES

9.1 PUBLICAÇÕES E PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

9.1.1 Capítulos de livros

- a) BIOPRESERVATION: FOODBORNE VIRUS CONTAMINATION AND CONTROL IN MINIMALLY PROCESSED FOOD

SOUZA, DORIS SOBRAL MARQUES; **SILVA, VILAINÉ CORRÊA DA**; MIOTTO, MARÍLIA; LINDNER, JULIANO DE DEA; RODRÍGUEZ-LÁZARO, DAVID; FONGARO, GISLAINE.

Elsevier, 2021, v.1, p. 93-106.

- b) ACTIVE CONTROL OF ENVIRONMENTAL ENTERIC VIRUSES AND BACTERIA USING BIOCHAR. ACTIVE CONTROL OF ENVIRONMENTAL ENTERIC VIRUSES AND BACTERIA USING BIOCHAR

SOUZA, ESTÊVÃO BRASILIENSE; DA SILVA, RAPHAEL; SAVI, B.; ROGOVSKI, P.; **SILVA, V. C.**; ZUCHI, I, D.; SOUZA, D. S. M.; SILVA, I. T.; CABRAL, A.; TREICHEL, H.; FONGARO, G.

Singapura: Springer, 2021, v. 1, p. 427-454.

9.1.2 Resumos publicados em anais de eventos

- a) VIRAL AND BACTERIAL DECAY IN OYSTER TISSUES UNDERGO TO RELAYING POST-HARVEST TREATMENT IN BRAZIL: A PRELIMINARY STUDY.

SOUZA, D. S. M.; **SILVA, V. C.**; SILVA, M. A.; LANZZARIN, P. K.; DAMO, A. C. M.; ROGOVSKI, P.; CADAMURO, R. D.; SAVI, B. P.; SOUZA, E. B.; SILVA, R.; MIOTTO, M.; FONGARO, G.; LINDNER, J. D.

XXXI Congresso Brasileiro de Virologia, 2020.

- b) VIRALL BRAZIL: BRAZILIAN VIROLOGY NETWORK FOCUSED ON ONE HEALTH APPROACH.

SILVA, R.; PAVI, C. P.; ZUCHI, I. D. P.; SAVI, B. P.; SOUZA, E. B.; CADAMURO, R. D.; ROGOVSKI, P.; GUTERRES, I. Z.; REIS, J. G.; **SILVA, V. C.**; SILVA, S. S. F.; SOUZA, D. S. M.; CRUZ, A. C. C.; SILVA, I. T.; FONGARO, G.

XXXI Congresso Brasileiro de Virologia, 2020.

- c) INACTIVATION OF NOROVIRUSES IN CRASSOSTREA GIGAS OYSTERS USING CURCUMA LONGA EXTRACT.

SILVA, V. C.; SOUZA, DORIS SOBRAL MARQUES; ELOIS, M. A.; SAVI, B. P.; MIOTTO, M.; DE DEA LINDNER, JULIANO; FONGARO, G.

XXXII Congresso Brasileiro de Virologia, 2021.

- d) BIOACCUMULATION DYNAMIC BY CRASSOSTREA GIGAS OYSTERS OF VIRUSES THAT ARE PROPOSED AS SURROGATES FOR ENTERIC VIRUS CONTAMINATION IN ENVIRONMENTAL SAMPLES.

ELOIS, M. A.; **SILVA, V. C.**; SAVI, B. P.; ROGOVSKI, P.; SILVA, M. A.; MIOTTO, M.; DE DEA LINDNER, JULIANO; FONGARO, G.; SOBRAL MARQUES SOUZA, DORIS.

XXXII Congresso Brasileiro de Virologia, 2021.

9.1.3 Curso de curta duração ministrado

- a) VIROLOGIA APLICADA À SAÚDE ÚNICA

FONGARO, G.; CADAMURO, R. D.; **SILVA, V. C.**; SILVA, R.; SOUZA, E. B.; SAVI, B. P.; REIS, J. G.; PAVI, C. P.; PADILHA, D. A.

Semana acadêmica da biologia, UFSC (2021)