

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM HIGIENE VETERINÁRIA E
PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DOS PRODUTOS DE
ORIGEM ANIMAL

FLÁVIA ALINE ANDRADE CALIXTO

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BACTERIOLÓGICOS EM
MEXILHÃO, *Perna perna*, DE MITILICULTURA DA BAÍA DE
ILHA GRANDE, RJ, SUBMETIDOS A IRRADIAÇÃO GAMA

UNIVERSIDADE
FEDERAL
FLUMINENSE

NITERÓI
2010

FLÁVIA ALINE ANDRADE CALIXTO

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BACTERIOLÓGICOS EM
MEXILHÃO, *Perna perna*, DE MITILICULTURA DA BAÍA DE
ILHA GRANDE, RJ, SUBMETIDOS A IRRADIAÇÃO GAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientador: Profa. Dra. ELIANA DE FÁTIMA MARQUES DE MESQUITA

Co-orientador: Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO

Co-orientador: Prof. Dr. MAURO CARLOS LOPES SOUZA

**Niterói
2010**

C154 Calixto, Flávia Aline Andrade

Avaliação dos parâmetros bacteriológicos em mexilhão, Perna, perna, de mitilicultura da Baía de Ilha Grande,RJ, submetidos a irradiação gama/ Flávia Aline Andrade Calixto; orientadora Eliana de Fatima Marques de Mesquita— 2010.

xxxf.

Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal)- Universidade Federal Fluminense, 2010.

Orientadora: Eliana de Fatima Marques de Mesquita

1.Irradiação de alimento. 2.Mexilhão.

3. Análise bacteriológica. 4.Baía da Ilha Grande I.Título.

CDD 664.0288

FLÁVIA ALINE ANDRADE CALIXTO

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BACTERIOLÓGICOS EM
MEXILHÃO, *Perna perna*, DE MITILICULTURA DA BAÍA DE
ILHA GRANDE, RJ, SUBMETIDOS A IRRADIAÇÃO GAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em ___ de _____ de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. ELIANA FÁTIMA MARQUES DE MESQUITA
UFF

Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO
UFF

Prof. Dr. MAURO CARLOS LOPES SOUZA
UERJ

Profa. Dra. DÁLIA DOS PRAZERES RODRIGUES
FIOCRUZ

Niterói
2010

A Deus, por ter me dado força mesmo nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Flávio Calixto e Marilei Calixto por todo incentivo e empenho a contribuir ao máximo na minha formação durante todos esses anos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Eliana Mesquita, por ter me aconselhado, apoiado e mesmo pelos conselhos, às vezes duros, que só me ajudaram a crescer nesta caminhada. É mais que uma orientadora, é uma grande amiga.

Ao co-orientador Prof. Dr. Robson Franco, que além de ser um excelente professor/orientador, me estendeu a mão quando mais precisei

Ao co-orientador Prof. Dr. Mauro Lopes, por todo carinho e auxílio no experimento. E aos funcionários do LIN/COPPE.

Ao Prof. Licínio da Silva, por toda a paciência e dedicação em transcrever a linguagem biomédica em números e estatísticas.

Aos funcionários do Setor de Pesca da Secretaria de Atividades Econômicas da Prefeitura de Angra dos Reis, em especial ao novo amigo André Araújo.

A todos os familiares e amigos pela paciência, torcida e ajuda, em especial, o amigo da família Paulo Costa, pelo apoio e ajuda ao dirigir e me auxiliar nos transportes.

Às amigas M.V. Cynthia Rubião, Neila Cortez, Ivone Costa e Luciana Rocha, por todo auxílio e palavras de incentivo na parte prática do meu experimento.

Ao meu namorado, Alexander Honório, por ter enxugado minhas lágrimas e me motivar a continuar, até mesmo virado noite comigo. Te amo!

Ao corpo técnico da FIPERJ por todo auxílio e compreensão.

Ao Prof. Dr. Raul Carvalho pelos ensinamentos e leituras.

À Profa. Dra. Dália Rodrigues por ter aberto as portas do laboratório do qual é responsável.

Aos amigos de Pós-graduação em Medicina Veterinária, por deixarem minha caminhada mais leve, em especial os amigos do QG que nomeio a Marta Xavier, em nome dos demais.

A todos do Programa de Pós Graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de POA, representados pelo funcionário Dráusio Ferreira.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior, pelo auxílio através de bolsa de estudo.

E a todos que me ajudaram direta ou indiretamente e não citei o nome.

RESUMO

A mitilicultura é uma das modalidades de aqüicultura mais produtiva que se conhece. Os mitilídeos estão entre os moluscos que apresentam maior valor comercial nos mercados nacional e internacional. A região da Baía de Ilha Grande é uma das maiores produtoras de moluscos bivalves no Estado do Rio de Janeiro. Altos índices de agentes etiológicos de doenças alimentares no Brasil tornam-nos um problema de Saúde Coletiva, sendo que muitos relatos implicam o consumo de moluscos bivalves como principais responsáveis. A disponibilidade de produtos seguros necessita do desenvolvimento de tecnologia como a irradiação de alimentos. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade bacteriológica de mexilhão (*Perna perna*) de cultivos da Baía de Ilha Grande/RJ e o uso da irradiação no produto *in natura*. Foram coletadas 15 amostras de mexilhão de cinco pontos de cultivo na Baía de Ilha Grande, RJ. Uma amostra de cada ponto foi irradiada com as doses 1,0 e 1,5 kGy. A análise bacteriológica (contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, presença de *Salmonella* spp., NMP de coliformes totais e fecais e NMP de *Vibrio parahaemolyticus*) seguindo instruções da legislação brasileira. As amostras apresentaram irregularidades quanto a *Salmonella* spp. e coliformes fecais, este para o grupo controle. O grupo controle apresentou-se impróprio para consumo. A dose de 1,0 kGy foi efetiva para a redução de coliformes fecais, porém não para a extinção de *Salmonella* spp.

PALAVRAS-CHAVES: mexilhão; avaliação bacteriológica; Baía de Ilha Grande; irradiação de alimentos.

ABSTRACT

The cultivation of shellfish is one of the most productive methods of aquaculture that is known. Mitilidae are among the mollusks that have higher commercial value in national and international markets. The region of the Ilha Grande Bay is one of the largest producers of bivalve molluscs in the State of Rio de Janeiro. High levels of foodborne disease in Brazil make it a public health problem, with many reports involving the consumption of bivalve molluscs as primarily responsible. The availability of safe products requires the development of technology such as food irradiation. The main objective of this study was to assess the bacteriological quality of mussels (*Perna perna*) from cultivations of the Ilha Grande Bay / RJ and the use of irradiation process on the fresh product. We collected 15 samples of mussels from five points of Ilha Grande Bay, RJ. A sample of each collected points was irradiated with doses of 1.0 and 1.5 kGy. The bacteriological analysis (*Staphylococcus* coagulase-positive count, *Salmonella* spp. presence, MPN of total and fecal coliforms and MPN of *Vibrio parahaemolyticus*) followed the instructions of the Brazilian legislation. Samples showed irregularities concerning *Salmonella* and fecal coliforms for the control group. The control group was not fit for consumption. The dose of 1.0 kGy was effective in reducing fecal coliform, but not for the extinction of *Salmonella* spp.

KEY WORDS: mussel; bacteriological evaluation; Ilha Grande Bay; food irradiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Caracteres estruturais da concha do bivalve *Perna perna*. Fonte: Ribeiro-Costa e Rocha (2002), f.20

Figura 2: Imagem de satélite da Baía de Ilha Grande com os pontos de coletas “plotados”. Adaptado de Google Earth (2010), f.54

Figura 3: Representação de plano amostral, amostra representativa e unidade amostral das análises realizadas, f.56

Figura 4: Representação esquemática da análise de Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, f.58

Figura 5: Representação esquemática da análise da presença de *Salmonella* spp., f.61

Figura 6: Representação esquemática da enumeração de Coliformes Totais e Fecais, f.63

Figura 7: Representação esquemática da análise de NMP de *Vibrio parahaemolyticus*, f.64

Figura 8: Distribuição da contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva por grupos de análises, f.68

Figura 9: Resultados positivos de *Salmonella* spp. em relação aos meios de enriquecimento utilizados, valores e proporções, f.71

Figura 10: Resultados positivos de *Salmonella* spp. em relação aos meios de isolamento utilizados, valores e proporções, f.72

Figura 11: Relação entre os meios de enriquecimento e isolamento, valores e proporções, f.72

Figura 12: Distribuição da contagem de coliformes totais por grupos de análises, f.73

Figura 13: Distribuição da contagem de coliformes fecais por grupos de análises, f.75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição da análise de variância (ANOVA) entre os grupos para os resultados de contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, f.68

Tabela 2: Descrição da análise de variância (ANOVA) entre os grupos para os resultados de NMP de coliformes totais, f.74

Tabela 3: Descrição da análise de variância (ANOVA) entre os grupos para os resultados de NMP de coliformes totais, f.77

Tabela 4: Valores dos parâmetros físico-químicos dos pontos de coleta, f.80

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA: “analyses of variance”

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

APHA: American Public Health Association

APT: Água Peptonada 1% Tamponada

a_w : atividade de água

BHI: “Brain Heart Infusion”

BPLS: Agar Bile Peptona Lactose-Sacarose

C: carbono

CO₂: gás carbônico

cod.: código

COPPE: Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e Pesquisa de Engenharia

CPS3%: Caldo Peptonado Sal 3%

CPS8%: Caldo Peptonado Sal 8%

CPSS: Caldo Peptonado Sem Sal

CRV: Caldo Rappaport Vassiliadis

CT: Caldo Tetrionato

DNA: “Deoxyribonucleic Acid”

DTA: doenças transmitidas por alimentos

D₁₀: dose de radiação necessária para reduzir uma população bacteriana em 90%

Eh: potencial de redução

EAEC: *E. coli* enteroagregativa

F₀: valor da estatística F observado

FAO: "Food and Agriculture Organization"

FDA: "Food and Drug Administration"

g: gramas

g.l.: grau de liberdade

GSTB: "Glucose Salt Teepol Broth"

Gy: Gray

h: hora

H₂S: Sulfeto de Hidrogênio

HE: Agar Hectoen

IAEA: Agência Internacional de Energia Atômica

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ICGFI: "International Consultative Group on Food Irradiation"

IN: Instrução Normativa

KGy: quilogray

km²: quilometro quadrado

L: litro

log: logarítmica

MeV: milhão de elétrons-volt

min: minuto

mL: mililitro

N: nitrogênio

Na: sódio

NaCl: Cloreto de sódio

NASA: "National Aeronautics and Space Administration"

NH₃: amônia

NMP: Número Mais Provável

n^o : número

OMS: Organização Mundial de Saúde

p: probabilidade

pH: potencial hidrogeniônico

POA: Produtos de Origem Animal

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

RNA: 'Ribonucleic Acid'

SD: Agar Salmonella Diferencial

spp: espécies

subsp.: sub-espécie

t: estatística T de Student

TCBS: Agar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose

TSI: Agar "Triplo Sugar Iron"

U\$: Dólar

UFC: Unidade Formadora de Colônias

UFC/g: Unidade Formadora de Colônias por grama

UFF: Universidade Federal Fluminense

UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro

UV: Ultra-violeta

°C: Graus Celsius

α : nível de significância

Δ : diferença das médias

%: percentual

®: marca registrada

μ L: microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO, f. 16

2 REVISÃO DE LITERATURA, f. 18

2.1 MEXILHÃO, f. 18

2.1.1 **Biologia**, f. 18

2.1.2 **Habitat e distribuição**, f. 21

2.1.3 **Mitilicultura e extrativismo**, f. 23

2.1.4 **Como alimento**, f. 26

2.2 IRRADIAÇÃO DE ALIMENTOS, f. 27

2.3 CONTAMINAÇÃO DE PESCADO, f. 33

2.3.1 ***Staphylococcus coagulase positiva***, f. 37

2.3.2 ***Salmonella spp.***, f. 40

2.3.3 **Coliformes totais e coliformes termotolerantes**, f. 43

2.3.4 ***Vibriose***, f. 46

3. METODOLOGIA, f.53

3.1 COLETA, PREPARAÇÃO E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS, f. 53

3.1.1 **Parâmetros físico-químicos dos pontos de coleta**, f.55

3.2 IRRADIAÇÃO DAS AMOSTRAS, f. 55

3.3 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS, f. 56

3.3.1 **Abertura dos mexilhões**, f. 57

3.3.2 **Contagem de *Staphylococcus Coagulase Positiva***, f. 57

3.3.3 Pesquisa de *Salmonella* spp., f. 59

3.3.4 Enumeração de Coliformes Totais e Fecais, f. 62

3.3.5 Número Mais Provável de *Vibrio parahaemolyticus*, f. 63

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS, f. 65

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO, f. 66

4.1 *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA, f. 67

4.2 *Salmonella* spp., f. 69

4.3 COLIFORMES TOTAIS E FECAIS, f. 73

4.3.1 Coliformes totais, f. 73

4.3.2 Coliformes fecais, f. 74

4.4 *Vibrio parahaemolyticus*, f. 78

4.5 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DOS PONTOS DE COLETA, f. 80

5 CONCLUSÕES, f. 81

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, f. 83

1 INTRODUÇÃO

A criação racional de mexilhões, ou mitilicultura, é uma das modalidades de aqüicultura mais produtiva que se conhece, fato atribuído principalmente aos seguintes fatores: caráter filtrativo dos mexilhões, que dispensa o fornecimento de ração suplementar, alto índice de conversão alimentar, que resulta em um rápido crescimento e alta produtividade; baixo custo das instalações de cultivo; facilidade de manejo e obtenção de mexilhões jovens para a utilização nas criações (MARQUES; PEREIRA, 1988).

Os pectinídeos estão entre os moluscos que apresentam maior valor comercial nos mercados internacionais, onde, atualmente, a demanda supera a oferta. A produção extrativa encontra-se em seu limite máximo, e a expansão da produção somente ocorrerá através da maricultura, que no ano de 2004 já participa com cerca de 75% do total da produção mundial (RUPP; BEM, 2004).

Segundo dados do Sistema de Informações Hospitalares (SIH) do Ministério da Saúde, ocorreram mais de 3.400.000 internações por DTA no Brasil, de 1999 a 2004, com uma média de cerca de 570 mil casos por ano. Presume-se alta morbidade (CARMO et al., 2005).

Por volta de 90% dos relatos de doenças por ingestão de pescado contaminado resulta, principalmente, da ingestão de moluscos bivalves (ASHIE et. al., 1996).

A disponibilidade de produtos seguros necessita do desenvolvimento de tecnologia de conservação, pois os moluscos em geral, como outros produtos pesqueiros são altamente susceptíveis à deterioração.

Dentre os métodos de conservação disponíveis para manter a qualidade e prolongar a validade comercial dos alimentos, vem se destacando a irradiação de alimentos, com a diminuição dos riscos à saúde coletiva, eliminando patógenos, a ação de microrganismos e processos químicos responsáveis pela degradação dos alimentos.

Pesquisadores em todo o mundo demonstram que o método de utilização da radiação gama para a conservação do alimento é confiável e seguro, podendo ser utilizado sem riscos toxicológicos, nutricionais ou outra forma danosa ao consumidor. O processo da radiação gama impede a divisão celular em bactérias, através da ruptura de sua estrutura molecular. As doses de radiação gama, adequadamente utilizadas, não provocam efeitos toxicológicos, os níveis de energia utilizados não são suficientes para induzir radioatividade nos alimentos. O alimento, de forma alguma, entra em contato com a fonte de radiação.

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a qualidade bacteriológica de mexilhão (*Perna perna*) de cultivos da Baía de Ilha Grande/RJ e o uso da irradiação no produto *in natura*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MEXILHÃO

2.1.1 **Biologia**

A classe Bivalvia abrange animais como mariscos, ostras e mexilhões. Os bivalves são comprimidos nas laterais e possuem uma concha composta por duas valvas, encaixadas em dobradiça dorsalmente. O pé como o restante do corpo é lateralmente comprimido, além disso, possui a cabeça mal desenvolvida. As brânquias nesta classe assumem outro papel além de trocas gasosas, de captação de alimentos (RUPPERT; BARNES, 1996).

A família Mytilidae é composta pelos seguintes gêneros animais usados na alimentação: *Mytilus*, *Modiolaria*, *Brachiodontes*, *Septifer* e *Lithophaga*; apresentando espécies marinhas e de água salobra. Os mitilídeos apresentam duas valvas iguais de forma oval ou triangular; duas impressões de músculos adutores (SANTOS, 1982).

Mexilhão é o termo utilizado para denominar as diversas espécies de moluscos bivalves da família Mytilidae, sendo os gêneros mais comuns *Mytilus*, *Perna* e *Mytella*. Dependendo da região do país, recebem diversos nomes, como marisco, sururu, bacu-cu e ostra-de-pobre (MAGALHÃES, 1985). Seu comprimento

varia entre 5 a 8 cm podendo atingir 14 cm; possui 3 a 4 cm de largura e 2 a 3 cm de espessura (RIBEIRO-COSTA; MARINONI, 2002).

Os animais possuem pé alongado em forma de língua, com um sulco no meio para a passagem do bisso. O bisso é usado para a fixação do mexilhão no substrato (RUPPERT; BARNES, 1996).

O mexilhão, espécie em estudo, compreende a seguinte taxonomia:

Filo Mollusca (Linnaeus, 1758)

Classe Bivalvia (Linnaeus, 1758)

Subclasse Pteriomorphia (Beurlen, 1944)

Ordem Mytiloidea (Férussac, 1822)

Superfamília Mytiloidea (Rafinesque, 1815)

Família Mytilidae (Rafinesque, 1815)

Subfamília Mytilinae (Rafinesque, 1815)

Gênero *Perna* (Retzius, 1788)

Espécie *Perna perna*

(Linnaeus, 1758)

As duas valvas da concha possuem uma dobradiça que permite a movimentação, o músculo adutor posterior é responsável por abrir e fechar a concha do mexilhão. Entre as valvas uma grande camada de tecido tem destaque, o manto; que possui uma borda com três pregas. A prega interna possui músculos radiais e circulares, a prega média é sensorial e a prega externa secreta a concha (RIBEIRO-COSTA; ROCHA, 2002; RUPPERT; BARNES, 1996) (Figura1).

A concha do *Perna perna* é equívale possuindo três margens: dorsal, ventral e posterior (Figura 1). A margem dorsal possui suave angulação próxima a metade da concha; a margem ventral é ligeiramente côncava; e a margem posterior é arredondada. Espécimes de *P. perna* provenientes de bancos naturais apresentam valvas mais espessas, desgastadas com menor altura e maior largura do que espécimes provenientes de cultivos, os quais ficam permanentemente submersos devido a ação abrasiva das ondas (RESGALLA Jr. et al., 2008). O umbo define a região anterior do mexilhão; e pela região ventral saem os filamentos do bisso (RIBEIRO-COSTA; ROCHA, 2002) (Figura 1).

A concha é lisa, apresentando apenas linhas concêntricas de crescimento. A face interna das valvas é nacarada com cicatrizes de inserção musculares: músculo anterior retrator do bisso, músculo mediano retrator do bisso, músculo retrator do pé, músculo posterior retrator do bisso e músculo adutor posterior. Além disso apresenta uma cicatriz fina, a linha palial, na margem ventral da valva (Figura 1). No gênero *Perna* não há músculo adutor anterior, sendo esta uma das características distintivas (RESGALLA Jr. et al., 2008; RIBEIRO-COSTA; ROCHA, 2002).

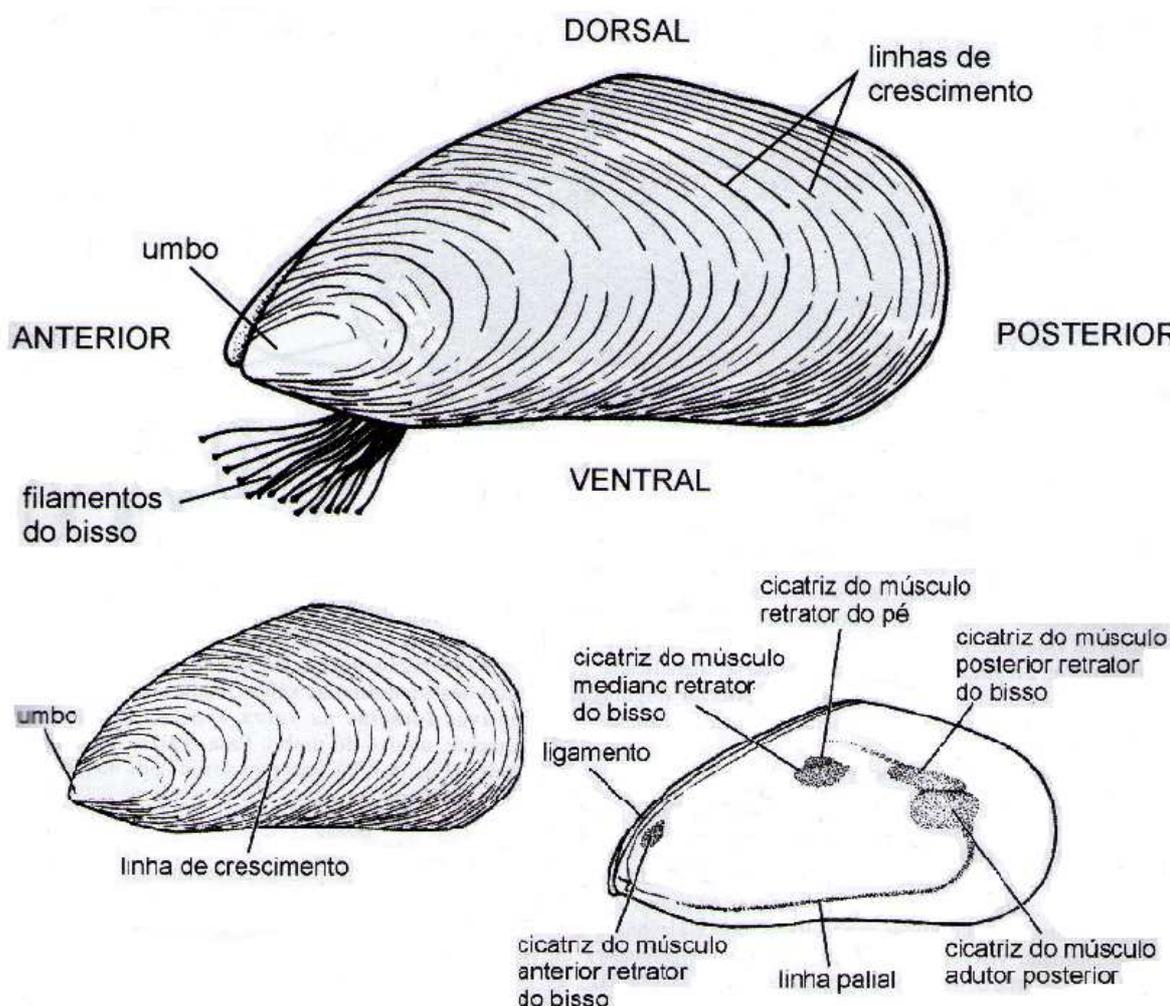


Figura 1: Caracteres estruturais da concha do bivalve *Perna perna*. Fonte: Ribeiro-Costa e Rocha (2002).

O mexilhão é uma espécie dióica, sem dimorfismo sexual externo. Interiormente, a diferenciação é possível graças à diferença de coloração dos tecidos gonádicos dos animais sexualmente maduros (RESGALLA Jr. et al., 2008).

O manto em animais maduros apresenta-se alaranjado nas fêmeas; e esbranquiçado nos machos. Esta cor é devido a presença de gônadas no manto, pois nesses animais as gônadas são difusas, estendendo-se para o manto (ibid.).

Na cavidade pericárdica, localizada próximo ao ângulo dorsal da concha, encontra-se o coração formado por um ventrículo e dois átrios (esquerdo e direito) (ibid.).

A musculatura extrínseca do *P. perna* é formada por três tipos de músculos: músculo adutor, músculos do bisso e músculos do pé. E a musculatura intrínseca é formada, principalmente, pelo músculo marginal do manto (RESGALLA Jr. et al., 2008).

Os mexilhões são animais filtradores que se alimentam de microrganismos capturados pela corrente de água que é produzida pelo batimento dos cílios das brânquias. A seletividade do seu alimento ocorre pelo tamanho da partícula. Esses animais filtram de 0,5 a 4 L/h dependendo do tamanho e das condições ambientais. (ibid.).

A alimentação dos mexilhões é um processo contínuo, só interrompido quando os indivíduos são expostos ao ar ou permanecem submetidos a qualquer outra condição ambiental desfavorável, como baixa salinidade ou reduzidos teores de oxigênio dissolvido na água (MARQUES, 1998).

2.1.2 Habitat e distribuição

O mexilhão é uma espécie nativa do continente africano, sendo introduzida na América do Sul há mais de 200 anos. Esse molusco bivalve filtrador se fixa em substrato duro onde vivem normalmente, por este motivo acredita-se que a espécie veio do continente africano fixada em casco de navios negreiros durante o período de colonização do Brasil. Atualmente, os bancos naturais da espécie no Brasil ocorrem, principalmente, entre Espírito Santo e Rio Grande de Sul (RESGALLA Jr. et al., 2008).

Os mexilhões se fixam ao substrato através de um conjunto de filamento denominado bisso após a fase larval planctônica. Estes filamentos são formados a

partir das glândulas localizadas na base do pé que secreta um líquido viscoso que se coagula. Os mexilhões são móveis, este pode se movimentar através dos seus pés, se as condições do ambiente não estão muito favoráveis. O mexilhão pode até desprender-se completamente em estratégia de sobrevivência através da força da tração do pé que leva ao rompimento do bisso (SANTOS, 1982).

Assim, após a fase larval planctônica, os mexilhões passam a ter hábitos bentônicos vivendo aderidos a qualquer substrato rígido como rochas, pilastras de portos, correntes e cordas submersas, cascos de embarcações e bóias. Mas habitam, preferencialmente, os costões rochosos na região entremarés até a zona infralitoral, em profundidades variáveis em locais mais expostos à ação das ondas. Pode chegar até 7 metros de profundidade dependendo da inclinação do costão, intensidade do batimento das ondas e da proximidade de fundos arenosos. Locais expostos à ação de fortes ondas e mais profundos podem possuir mexilhões até em maiores profundidades. Em Arraial do Cabo, *P. perna* são encontrados em lajes submersas a 35 metros. A maior concentração de mexilhões se dá na parte inferior da zona entremarés até um metro de profundidade, podendo formar densas populações com até 20.000 animais por metro quadrado (RESGALLA Jr. et al., 2008).

O mexilhão *P. perna* possui uma ampla distribuição ocorrendo no Mar Mediterrâneo; continente africano e no Oceano Índico. Na América do Sul é uma espécie exótica estabelecida a mais de 200 anos; no Brasil, ocorre desde a Baía de Vitória, ES até Rio Grande, RS (ibid.).

Perna perna é uma espécie capaz de resistir a ampla variações de salinidade (19 a 49 ppm, ótima entre 34 e 36 ppm) e temperatura (5 a 30°C, ótima 21 a 28°C) (ibid.).

Estudo sobre a influência da temperatura e da salinidade no desenvolvimento larval de *P. perna* e *P. viridis*, concluiu que o tempo para a metamorfose foi independente da salinidade, dentro de uma faixa ótima de temperatura, situada na faixa de 18 a 30°C (SIDDALL, 1979).

Pesquisa feita sobre a sobrevivência do mexilhão *P. perna* em diferentes salinidades, indica que este molusco sobrevive na faixa de salinidade de 19 a 44 ‰ (SALOMAO et al., 1980).

Romero e Moreira (1981) estudaram os efeitos combinados da salinidade e da temperatura na sobrevivência larval de *Perna perna*. As larvas tiveram pouca resistência a variações de temperatura e salinidade. Valores extremos de temperatura reduziram a amplitude de tolerância a baixas salinidades, enquanto que salinidades muito baixas, igualmente reduziram a tolerância a altas temperaturas.

2.1.3 Mitilicultura e extrativismo

Perna perna é uma espécie subtropical que normalmente tem um crescimento mais rápido do que espécies originárias de clima temperado. Além disso, o crescimento de mexilhões em bancos naturais varia de acordo com o tempo de emersão dos animais. Animais exposto periodicamente ao ar (região entremarés) cresce mais lentamente; tanto pelo estresse fisiológico como privação de alimento. (RESGALLA Jr. et al., 2008).

A grande maioria dos bivalves comercializados no Brasil é proveniente do ambiente natural, o que torna essa atividade economicamente importante, não só em termos de ocupação da força de trabalho, mas também na formação de renda do setor primário da economia, constituindo um dos elos da cadeia produtiva do agronegócio da malacocultura (HENRIQUES et al., 2000). Os bancos naturais do mexilhão *P. perna* são explorados desordenadamente pelos extratores "marisqueiros" (HENRIQUES, 2004).

A produção nacional anual de mitilídeos está ao redor de 28.000 toneladas, sendo que apenas 47% dela são comercializadas, ficando o restante destinado ao consumo dos próprios extratores, para sua subsistência (PEREIRA; GRAÇA-LOPES, 1995).

A produção aquícola mundial teve um crescimento de 187,6 % entre 1990 e 2001, aumentando de 16,8 milhões para 48,4 milhões de toneladas. No Brasil, esta atividade aumentou 925 %, pois a produção de 20,5 toneladas em 1990 atingiu 210 mil toneladas em 2001. Entre os grupos cultivados na década de 90 os moluscos

foram os que apresentaram a maior taxa de variação relativa de crescimento (11.848%) em termos de produção cultivada e de receitas geradas (20.139 %) (BORGHETTI et al., 2003).

A malacocultura (cultivo de moluscos) utiliza técnica simples e tem baixo investimento com produção de alimentos de alto valor comercial como ostras, vieiras e mexilhões. Além disso, não há gastos com a alimentação já que esta provém do ambiente natural (RESGALLA Jr. et al., 2008).

O cultivo de mexilhão começou casualmente na Europa em 1235 quando um náufrago irlandês cravou estacas de madeira na Baía de l'Aiguillon e observou que estas serviram de ótimo substrato para coleta e engorda de mexilhões que tornaram-se sua principal fonte de alimento (ibid.).

O mexilhão *Perna perna*, conhecido como “brown mussel” no mercado internacional, é a espécie mais cultivada no hemisfério sul por apresentar resultados bastante positivos no cultivo (ibid.).

A mitilicultura ou cultivo de mexilhões desenvolveu-se muito no Brasil durante a última década, principalmente no Estado de Santa Catarina, onde a produção anual da espécie *Perna perna* saltou de 190 toneladas em 1990 para 9.460 toneladas em 1999 (ROCZANSKI et al., 2000). A expansão dessa atividade motivou a entrada de inúmeras famílias de comunidades pesqueiras no processo produtivo, com reflexos positivos na economia regional e em toda a cadeia de produção. O litoral norte do Estado de São Paulo, compreendendo os municípios de Ubatuba, Caraguatatuba, São Sebastião e Ilhabela, apresenta condições geográficas e ambientais bastante favoráveis ao desenvolvimento da mitilicultura, detendo assim um enorme potencial em termos de produção comercial (MARQUES, 2003).

A ostra japonesa *Crassostrea gigas* e o mexilhão *Perna perna*, são as principais espécies cultivadas. Esta última espécie apresentou um crescimento superior a 4.000%, passando de 190 t em 1991 para 8.132,4 toneladas em 2003 (MANZONI; MARTINS, 2006).

Os mexilhões estão sendo cultivados em vários pontos do litoral brasileiro, o que permite aumentar sua oferta à população sem exaurir os estoques naturais (RESGALLA Jr. et al., 2008).

No Brasil o sistema de cultivo mais utilizado para mexilhões é do tipo suspenso flutuante (“long-line”), em que as cordas são presas a uma linha mestre que flutua na superfície com o auxílio de flutuadores (SANTOS, 2009).

O cultivo de mexilhões em Santa Catarina, como atividade comercial, teve o seu início em 1990 na região da Enseada do Brito (Palhoça) e devido à baixa profundidade neste local os cultivos eram realizados em estruturas fixas, a estrutura apresentava um reduzido custo de implantação. Os resultados positivos dos mexilhões cultivados neste local e utilização de materiais originários da pesca resultando em baixo investimento motivaram o ingresso de pescadores de diferentes localidades nesta atividade (MANZONI; MARTINS, 2006).

Atualmente, o cultivo de mexilhões é praticado no litoral brasileiro nos estados de Santa Catarina, do Espírito Santo, do Rio de Janeiro, de São Paulo e do Paraná, apresentando a maior taxa de crescimento dentro da maricultura de 22% ao ano, o que representa 7,5% da produção aquícola do país (RESGALLA Jr. et al., 2008).

O custo total por quilo de mexilhão, calculado a preços de setembro de 2004, fica em R\$ 0,82, com um valor de venda de R\$ 1,20. Isto dá uma receita bruta por ha de cultivo de R\$ 48.000,00. Sendo o custo total R\$ 32.732,04, o lucro líquido por ciclo ha seria de R\$ 15.267,96 (INSTITUTO CEPA, 2004). Devido ao alto valor do produto e aos baixos custos de produção, a malacocultura está entre diversos programas governamentais de desenvolvimento econômico e social (SANTOS, 2009).

No Rio de Janeiro, a obtenção do mexilhão é principalmente a extrativista, especialmente na Baía de Guanabara, que representa a mais importante atividade pesqueira. A Associação Livre de Maricultores do Estado do Rio de Janeiro (ALMARJ), localizada em Jurujuba, é a principal responsável pelo beneficiamento do animal em alimento, comercializado pré-cozido e desconchado, embalado em polietileno (LAGE, 2006).

Porém, o IBAMA (BRASIL, 2003) levando em consideração aspectos como a importância sócio-econômica que a atividade de mitilicultura assumiu como mantenedora de inúmeras famílias, como alternativa para pescadores que não obtém, na pesca extrativa, meios suficientes para subsistência; e que a retirada de sementes de mexilhão dos costões naturais para atender às demandas de cultivo, têm promovido depredação aos bancos naturais destes moluscos; determinou a

proibição anual da extração de mexilhão nos costões naturais, sob qualquer método, da espécie *Perna perna*, no litoral dos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, no período de 01 de setembro a 30 de novembro e de 01 de janeiro a 28 de fevereiro de cada ano.

Em 1995, a Prefeitura de Angra dos Reis incentivou a mitilicultura através do Projeto de Desenvolvimento Sustentável para a Ilha Grande com a finalidade de fornecer aos moradores da Ilha Grande uma fonte de renda alternativa evitando dessa forma a evasão dos habitantes locais e a ação da crescente especulação imobiliária. A Ilha Grande está localizada a sudeste do Município de Angra dos Reis, sendo a maior ilha do Estado do Rio de Janeiro, com 187 km² de área territorial (LOPES et al., 2010).

Por ser uma monocultura intensiva, a mitilicultura está potencialmente suscetível a infestações, reduzindo o lucro dos produtores, pois, pode representar até 90% do peso do produto desconchado (MARENZI; BRANCO, 2006).

2.1.4 Como alimento

Os mexilhões por possuírem ampla distribuição geográfica, serem organismos dominantes e de bom crescimento representam uma importante fonte de alimento em muitas partes do mundo (RESGALLA Jr. et al., 2008).

O mexilhão é chamado como ostra de pobre, sendo consumido cru ou cozido. Quando cozido é muito apreciado como um quitute já consagrado: mexilhão ao vinagre (SANTOS, 1982).

Os mexilhões também são fonte de alimento alternativo, quando a pesca artesanal não é bem sucedida (RESGALLA Jr. et al., 2008).

No Brasil, a comercialização dos mexilhões se dava basicamente de duas maneiras: na concha ou desconchado, em embalagens plásticas de 500 gramas ou um quilograma. Atualmente com o aumento da competitividade entre os produtores ocorreu uma diversificação nas formas de apresentação do mexilhão para comercialização, através do processamento do produto e conseqüentemente agregando valor (SANTOS, 2009).

A composição química do mexilhão varia com o sexo e a fase do ciclo reprodutivo em que os indivíduos se encontram. O mexilhão fresco é constituído por 10 % de proteína, 3,5% por carboidratos e 1,5% por lipídeos sendo considerado um alimento de excelente qualidade nutricional (RESGALLA Jr. et al., 2008).

O teor de lipídeos desses animais é baixo comparado à maioria das carnes e são importantes fontes de ácidos graxos poliinsaturados, principalmente ômega 3 (ibid.).

Além disso, os mexilhões são importantes fontes de cálcio, ferro e zinco (ibid.).

2.2 IRRADIAÇÃO DE ALIMENTOS

O início das pesquisas sobre a irradiação (1890-1940) está ligado à física da radiação e ao desenvolvimento dos sistemas e fontes utilizados no processo (MOLINS, 2001).

Em 1895 W. K. Von Roentgen descobriu os raios X. No ano de 1896 Henri Becquerel torna pública a descoberta da radioatividade, sendo que, no mesmo ano, H. Minsch publicou uma proposta para a utilização das radiações ionizantes na conservação de alimentos. No ano de 1902 a cientista Marie Curie descobriu a existência do rádio. Em 1904 J.C. Prescott publicou pesquisas sobre o efeito bactericida das radiações. De 1905 a 1920 observa-se um período de investigação sobre a natureza e sobre os efeitos das radiações ionizantes (MOLINS, 2001; SATIN, 2000).

O período de 1940 –1970 foi de intensa investigação e desenvolvimento, com inúmeras pesquisas sobre as condições favoráveis à qualidade sanitária dos alimentos submetidos à irradiação (MOLINS, 2001).

Os Estados Unidos da América desenvolveram pesquisas sobre o processo de irradiação através do programa “Atoms for Peace” estabelecido pelo Presidente Dwight David Eisenhower (1890-1969), a partir da década de 50. Em 1970, a “National Aeronautics and Space Administration” (NASA) adotou a esterilização de

carne para seu consumo no espaço. Na década de 60, o “Food and Drug Administration” (FDA) depois de minuciosa investigação, autorizou a utilização da irradiação em trigo e batatas. Em 1980, foi aprovado o uso do processo em temperos e especiarias. No mesmo ano, a “Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee on Wholesomeness of Irradiated Food” concluiu que os alimentos submetidos à irradiação eram seguros, quando se utiliza doses até 10 kGy, isto sem estudos adicionais (GERMANO, GERMANO, 2003). Em 1990, a FDA aprovou a irradiação de carne de aves para o controle de *Salmonella* e em 2000 liberou para o controle de *Samonella* em ovos (MOLINS, 2001).

No ano de 1979, o código de práticas para irradiadores foi regulamentado através do Codex CAC/RCP 19 (CODEX ALIMENTARIUS, 2008a). As normas gerais para alimentos irradiados foram estabelecidas através do Codex STAN 106 (CODEX ALIMENTARIUS, 2008b).

Inúmeras organizações internacionais, como a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), a Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceram o potencial do processo de irradiação para melhorar a qualidade e segurança dos alimentos desde 1950. Esta tendência gerou em 1964 a Divisão da Reunião FAO/IAEA de Técnicas Nucleares para Alimentos e Agricultura centralizada na Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) em Viena, na Áustria (MOLINS, 2001).

Em 1985, foram aprovadas as normas gerais para a irradiação de alimentos através da Portaria DINAL nº 9 (BRASIL, 1985) o processo foi autorizado pela legislação brasileira em 29 de agosto de 1973, através do Decreto nº 72.718 (BRASIL, 1973).

O “International Consultative Group on Food Irradiation” ICGFI estabeleceu normas de boas práticas para irradiação de alimentos em 1991 (ICGFI, 1991).

A irradiação de alimentos está regulamentada no Brasil. A legislação brasileira, divulgada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em janeiro de 2001, é considerada a mais avançada do mundo porque incluiu as recomendações mais recentes do “International Consultative Group on Food Irradiation / Vienna” (ICGFI, 1999), as quais garantiram limitação qualitativa da dose ao invés de quantitativa. Segundo essa legislação a irradiação é o processo físico de

tratamento que consiste em submeter o alimento, embalado ou à granel, a doses minuciosamente controladas de radiação ionizante, com finalidade sanitária, fitossanitária e/ou tecnológica (BRASIL, 2001b).

A Resolução - RDC Nº 21 de 26 de janeiro de 2001 da ANVISA aprova o Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos. Esta é a resolução em vigor pela legislação brasileira. Aplica-se a qualquer alimento desde que sejam observadas as seguintes condições: 1) a dose mínima absorvida deve ser suficiente para alcançar a finalidade pretendida; 2) a dose máxima absorvida deve ser inferior àquela que comprometa as propriedades funcionais e/ou os atributos sensoriais do alimento (BRASIL, 2001b).

As principais fontes de energia ionizante utilizadas são os raios gama, feixes de elétrons abaixo de 10 MeV e raios X abaixo de 5 MeV. Os raios gama são os mais usados principalmente os emitidos pelos isótopos radioativos cobalto-60 (BRASIL, 2001b; FORSYTHE, 2002; GERMANO, GERMANO, 2003; SATIN, 2000). O poder de penetração dos raios gama é 100 maior que do dos raios beta (feixes de elétrons) (SATIN, 2000).

Os raios gama constituem uma radiação eletromagnética de alta frequência e são altamente penetrantes na matéria (MASSAGUER, 2005).

O cobalto-60 é o radioisótopo mais freqüentemente utilizado e possui uma produção mais viável (SATIN, 2000; VITAL; LIMA, 2006). O cobalto 60 é isótopo artificial, originado da irradiação por nêutrons, de cobalto natural, operação realizada em reatores potentes. O tempo de meia vida desta fonte é cerca de 5,3 anos (EVANGELISTA, 2005a).

Irradiação é o processo de aplicação de energia ionizante a um determinado alvo específico, no caso, um alimento (MASSAGUER, 2005).

A irradiação de alimentos só se justifica quando responde a uma necessidade tecnológica e/ou é benéfica para a proteção da saúde do consumidor. Não deverá substituir as práticas adequadas de higiene ou de fabricação ou boas práticas agrícolas (CODEX ALIMENTARIUS, 2008a).

A dose de processamento é a energia necessária para atingir o efeito desejado no produto. Esta é determinada através de pesquisa com radiação envolvendo determinação da relação dose-efeito no produto (IAEA, 2008). A unidade de medida da dose é o Gray (Gy) que corresponde 1 joule de energia absorvida em

um quilograma. A dose pode ser identificadas em kilogray kGy que representa 1000 Gy (SATIN, 2000).

De acordo com a dose aplicada e finalidades pretendidas, são três os processos de radiação de alimentos (EMBRARAD, 2008; EVANGELISTA, 2005b, SATIN, 2000). Radurização: aplicação de dose até 1 kGy (baixa dose). Produz a inibição do brotamento de bulbos e tubérculos, retarda período de maturação e deterioração de frutas e hortaliças, desinfestação de cereais e leguminosas; radicação: aplicação de dose entre 1 e 10 kGy (doses intermediárias). Tem ação de pasteurização, é empregada em sucos de frutas e carnes, retarda a deterioração de pescado; radapertização: utiliza doses altas, acima de 10 kGy. Tem ação de esterilização comercial. É utilizada em especiarias, rações humanas e carnes.

A irradiação de alimentos é eficazmente utilizada em cerca de 37 países, é considerada um processo que garante a qualidade dos alimentos (CNEN, 2006). As alterações nos alimentos em decorrência deste processo são similares a outras resultantes em processos como cozimento, apertização, pasteurização entre outros processo de alta temperatura (SHEA, 2000).

O processo de irradiação não constitui um “milagre” técnico, com capacidade para resolver todos os problemas relacionados com a preservação de alimentos, não se justificando a sua utilização indiscriminada para tratamento de todos os tipos de alimentos. Além disso, na maioria das vezes, os alimentos irradiados devem ser submetidos às técnicas convencionais de conservação (VITAL; LIMA, 2006).

A radiação gama tem uma utilização ampla em aplicações industriais tais como: esterilização de material médico-cirúrgico, odontológico, embalagens, fármacos, cosméticos, fitoterápicos, processamento de alimentos, pedras preciosas e outras. A irradiação de alimentos é eficiente para tratamento de um leque de produtos como condimentos, especiarias, ervas, chás, grãos, farináceos, bulbos, raízes e tubérculos, produtos de origem animal, frutas secas, frutas e vegetais (EMBRARAD, 2008).

A irradiação de alimentos está dividida em duas bases: a prevenção de perdas de alimentos; e descontaminação microbiológica e inativação parasitária do alimento. A primeira inclui perdas induzidas por processos fisiológicos como germinação de bulbos e tubérculos, ou a proteção dos alimentos contra bactérias deteriorantes e pragas durante o armazenamento. O segundo grupo está

relacionado a segurança dos alimentos eliminando os perigos biológicos (MOLINS, 2001).

Evangelista (2005a, b) e Satin (2000) citam como objetivos da irradiação: esterilização, pasteurização, desinfestação e inibição de germinação, aumentar a validade comercial dos alimentos, complementar a atuação de outros processos de conservação, retardar o ciclo de maturação de frutas, melhorar determinadas características sensoriais do produto e facilitar o armazenamento de produtos estocados em baixas temperaturas.

Entre as aplicações mais importantes da irradiação está a destruição e redução das bactérias patogênicas nos alimentos. A vida e a reprodução desses microrganismos dependem de seus ácidos nucléicos DNA e RNA. Como estas são macromoléculas complexas são muito sensíveis a ionização e conseqüentemente, basta exposições a radiação gama relativamente baixas para reduzir drasticamente o potencial patogênico das bactérias nos alimentos (SATIN, 2000). Este dano no material genético evita a multiplicação e inativa a maioria das funções celulares. O dano no material genético ocorre por colisão direta com a energia radiante ou como resultado a ionização de uma molécula adjacente que aciona o material genético (efeito indireto). Esta molécula geralmente é a água (MOLINS, 2001).

A irradiação pode substituir a utilização dos aditivos químicos em alimentos e também de produtos químicos usados para a desinfestação de frutas após a colheita (USP, 2006).

Em qualquer processo não químico de destruição de microrganismos em alimentos, a redução é feita de maneira logarítmica (\log_{10}) para conseguir determinado nível de segurança. Além disso, os esporos são mais resistentes a irradiação que as células vegetativas, em parte pela diferença do teor de água entre essas formas minimizando o efeito secundário da irradiação (MOLINS, 2001).

Vírus, esporos, príons e toxinas são resistentes a irradiação, em presença no alimento, a radiação não se torna efetiva (SHEA, 2000).

A capacidade da radiação inativar microrganismos vem sendo a principal razão do seu uso em alimentos. A radiação é um meio efetivo de destruição de bactérias patogênicas ou não, assim como parasitas. Assim, pode ser análogo a diversos outros processos utilizados para a eliminação de microrganismos como por exemplo, tratamento em altas temperaturas (MOLINS, 2001).

Estima-se que o uso da irradiação em alimentos poderia reduzir um milhão de casos e prevenir 6.000 casos de doenças graves e 350 mortes originadas por contaminação do alimento (TAUXE, 2001).

A redução das perdas de alimentos pós-colheita é um importante benefício da irradiação, em potencial, o que seria determinante para a redução da fome e da desnutrição (GERMANO, GERMANO, 2003)

A destruição de microrganismos causadores de doenças transmitidas por alimentos (DTA) constitui um exemplo da aplicação da energia nuclear para fins pacíficos (NORBERG et al., 2000). O manuseio inadequado de alimentos aumenta o risco de contaminação dos alimentos. A utilização da irradiação tem demonstrado ser extremamente efetiva na redução da exposição e risco aos patógenos veiculados por alimentos. Está sendo empregada para diminuir ou eliminar vários patógenos em alimentos entre os quais pescado (SATIN, 2000).

O uso da irradiação em alimentos de maior perecibilidade, como as carnes, mostra-se eficiente na inativação de microrganismos e enzimas. Na maioria das vezes, o método se complementa com o de refrigeração, consolidando assim a segurança da conservação do produto (EVANGELISTA, 2005a).

Além disso, as más condições de manipulação, armazenamento e transporte do pescado fresco muito contribuem para a perda da qualidade e mesmo deterioração do pescado desembarcado. Nesse caso, está incluído o Brasil, onde o quadro é precário em quase todos os locais de descarga de pescado. As práticas tradicionais de passagem do pescado fresco através de um ou mais intermediários, em sua viagem do pescador ao consumidor final, também contribui decisivamente para a perda da qualidade e a deterioração do pescado fresco disponível ao consumidor nas feiras livres, mercados, peixarias e supermercados do país (SANTOS, 2006). Devido à alta perecibilidade do pescado, métodos alternativos de conservação são muito importantes. O tipo de conservação utilizada define o tempo de validade comercial ou de conservação do produto. Essa conservação deve ser tal que o alimento conserve ao máximo suas qualidades sensoriais e nutritivas (NEIVA, 2009).

A irradiação de pescado é efetuada como complemento do processo de frio, para lograr a dilatação da validade comercial do produto, na faixa de temperatura de

0 a 5°C (EVANGELISTA, 2005a). Pescado, incluindo os mariscos e derivados, frescos ou congelados necessitam de doses máximas de 7,0 kGy para a redução de microrganismos patogênicos, de 3,0 kGy para ampliação da validade comercial e de 2,0 kGy para o controle da infecção por parasitas (MOLINS, 2001).

O uso e finalidade da radiação em pescado se fazem de acordo com a dose: doses baixas (0,01 a 1 kGy) servem para inibir o desenvolvimento de ovos e larvas de insetos em pescado seco; doses entre 0,75 e 2,5 kGy servem para pasteurizar o pescado fresco, contribuindo para o aumento do prazo comercial do produto refrigerado, como filés de peixe e camarão. Doses intermediárias (2,5 a 10 kGy) são capazes de destruir bactérias patogênicas não formadoras de esporo em pescado congelado e desidratados; em outros produtos, aumentam a validade comercial e assim protege a saúde do consumidor (OGAWA; MAIA, 1999).

A dose de irradiação necessária para assegurar a qualidade higiênica de pescados frescos ou congelados varia de 1 - 5 kGy, dependendo do produto e do seu estado físico. No geral, as espécies magras são mais adequadas à irradiação do que as consideradas gordas como atum, arenque e salmão, uma vez que nestas a presença de gorduras pode ocorrer o desenvolvimento de ranço ou alteração de cor devido ao processo (LANDGRAF, 2008). Porém, estudos realizados com cavala mostram que a composição da gordura é mais importante do que a sua quantidade, uma vez que este peixe, apesar de apresentar maior teor de gordura do que salmão, atum e arenque, não apresentou os mesmos problemas (ASHIE et al., 1996). Mais recentemente, o uso da irradiação de pescado visa reduzir para níveis considerados seguros, do ponto de vista microbiológico, as populações de *Vibrio parahaemolyticus* e *V. vulnificus* em ostras e mariscos vivos que são freqüentemente consumidos crus (LANDGRAF, 2008).

Os custos de irradiação variam de U\$10 a U\$15 por tonelada para uma aplicação de baixa dose a U\$100 a U\$250 por tonelada para aplicação de alta dose. Estes custos são competitivos com outros tratamentos, e em alguns casos, a irradiação pode ser consideravelmente menos dispendiosa (DELINCÉE, 1998).

2.3 CONTAMINAÇÃO DE PESCADO

Os agentes etiológicos de doenças transmitidos pelo pescado são causadas por agentes biológicos, químicos e físicos. Bactérias, vírus e parasitas patogênicos são os agentes patogênicos biológicos. As bactérias podem ser associadas ao ambiente aquático habitado pelo pescado, como os vibrios (*V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*), *Listeria* spp., *Clostridium botulinum*, ou associados a contaminação como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* e o *Staphylococcus aureus* (SANTOS, 2010).

A segurança microbiológica de produtos crus depende do controle desenvolvido durante a produção, preparação, armazenamento e a comercialização. Produtos de origem animal estão sujeitos a contaminação microbiana a partir de várias fontes como por meio da água e de manipuladores. O conhecimento das prováveis fontes de contaminação é fundamental para controle de produtos crus (RIEDEL, 1992).

Os microrganismos causadores de doenças alimentares são divididos em dois grupos: infecciosos como a *Salmonella* spp. e *E. coli*; e intoxicantes como *S. aureus* (FORSYTHE, 2002).

O consumo de bivalves é registrado como responsável por inúmeros surtos epidêmicos, respondendo diretamente por problemas na Saúde Coletiva, principalmente quando estes moluscos são ingeridos crus ou mal cozidos e a qualidade sanitária do ambiente aquático onde os moluscos foram capturados estiver comprometida (JOSÉ, 1996).

Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS indicam 6.602 surtos de DTA no Brasil durante o período de 1999 a 2008, envolvendo 117.330 pessoas doentes e 64 óbitos. As informações disponíveis no Sistema apontam que a maior parte dos surtos de DTA (84%) é causada por bactérias patogênicas e/ou suas toxinas, predominando *Salmonella* spp (42,9%), seguida por *Staphylococcus* sp (20,2%) e outras bactérias com percentual menos expressivo (SANTOS, 2010).

A microbiota do pescado reflete a água de onde vivem, principalmente no caso de mariscos, além disso, os microrganismos podem ser adquiridos durante as etapas de processamento (JAY, 2005). A contaminação química e bacteriológica do ambiente marinho, principalmente em regiões de alta densidade demográfica; além de colocar em risco a saúde humana, pode causar danos às espécies presentes no

habitat, como por exemplo, prejudicar a resistência dos bivalves a fatores abióticos, tais como exposição ao ar e variação da temperatura e salinidade ou fatores bióticos como a predisposição ao parasitismo (HENRIQUES, 2004).

Poucos estudos existem no Brasil sobre a qualidade microbiológica dos bancos naturais de moluscos e a influência da alteração de vários fatores bióticos e abióticos sobre os animais que vivem nesse ambiente (HENRIQUES, 2004).

Devido ao processo de alimentação onde filtram grande quantidade de água pelas brânquias, os moluscos bivalves concentram muitos microrganismos em seus tecidos sendo a microbiota reflexo do seu ambiente. Por isso são reconhecidos como reservatórios de diversos patógenos microbianos (MOLINS, 2001).

A contaminação de águas costeiras pode ameaçar o cultivo de moluscos bivalves que, sendo organismos filtradores, têm capacidade de concentrar e acumular altas densidades de bactérias, protozoários e vírus patogênicos, além de metais e outros compostos químicos tóxicos (RODRIGUES, 1998; RODRIGUES-ARIZA et al., 1992). O pescado pode ser veiculador de um grande número de microrganismos patogênicos para o homem, principalmente decorrente da contaminação ambiental. O lançamento dos esgotos nas águas de reservatórios, lagos, rios e mar é a causa poluidora mais comum registrada no mundo inteiro (ORDÓÑEZ et al., 2005; REICHENHENBACH-KLINKE et al., 1982).

Peixes capturados em águas limpas e muito frias carregam um número menor de microrganismos que peixes capturados em águas mornas (LÓPEZ et al., 1994).

O consumo de moluscos é responsável por inúmeros surtos epidêmicos e responde, diretamente, pelos problemas de Saúde Coletiva, ocasionados principalmente, quando os moluscos são ingeridos *in natura*. Esta incidência se deve à qualidade das águas, nas quais estes se encontram e às técnicas de manipulação pós-colheita (BEIRÃO et al., 2000; CARDONHA et al., 1994; COOK, 1991; JOSÉ, 1996). A microbiota dos moluscos varia muito, dependendo da qualidade da água do habitat, da água de lavagem e outros fatores de contaminação (JAY, 2005).

Os patógenos alimentares conhecidos incluem parasitas animais multicelulares, protozoários, fungos, bactérias, vírus e possivelmente príons. Os microrganismos causadores de doenças alimentares podem ser transmitidos a partir de fezes contaminadas, pelos dedos de manipuladores de alimentos com hábito de

higiene insatisfatórios, por insetos voadores ou rasteiros e também pela água (JAY, 2005).

A microbiota de moluscos varia muito, dependendo da qualidade da água de onde foram retirados, da qualidade da água da lavagem e de outros fatores. Gêneros de bactérias como *Escherichia*, *Enterobacter*, *Lactobacillus* e *Pseudomonas* foram isolados em ostras deterioradas. Mexilhões e vieiras possuem deterioração semelhante as das ostras (JAY, 2005). Os mais importantes patógenos entéricos proveniente da poluição de águas com resíduos humanos e/ou animais, incluem *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter jejuni* e cepas enterotóxicas de *Escherichia coli* (MOLINS, 2001).

O hábito de consumo de ostras ocorre *in natura* com algumas gotas de limão e os mexilhões apenas levemente aquecidos para a abertura das valvas e a retirada da parte corpórea do molusco, a qual não passa por nenhum outro processo de cocção antes de ser consumida. Este tipo de consumo torna-se um risco por não ter uma etapa de cozimento adequada que ajudaria a reduzir o número de microrganismos presentes, podendo resultar, assim, em infecções provocadas por microrganismos patogênicos (PEREIRA et al., 2004).

As enfermidades mais comuns, relacionadas aos mariscos, são as febres tifóides e paratifóides, as salmoneloses, a infecção por *Vibrio parahaemolyticus*, a hepatite viral do tipo A (hepatite infecciosa) (WOOD, 1979).

As más condições de armazenamento também podem favorecer a contaminação microbiana de moluscos bivalves. A ausência de refrigeração adequada (abaixo de 4°C) favorece a multiplicação dos microrganismos, entre eles os patogênicos (PEREIRA et al., 2004).

Todos os tipos de produtos de pescado precisam ter a microbiota contaminante dentro dos limites impostos pela legislação vigente, sob pena de não poder ser comercializado e ou exportado (GUIMARÃES et al., 2001; MOURA et al., 2003). A legislação brasileira vigente é a Resolução RDC nº12 (BRASIL, 2001a).

Os microrganismos sobre os quais a legislação estabelece limites são aqueles que quase sempre não alteram a aparência do pescado, logo a razão de suas limitações decorre do fato de serem patogênicos para o homem e não deteriorantes do alimento (HONDA et al., 2000; VIEIRA, 2004).

Doses intermediárias de radiação (1 a 10 kGy) são aplicadas com a finalidade de eliminar microrganismos patogênicos de produtos como frutos-do-mar, sendo a irradiação de alimentos um importante processo capaz de eliminar patógenos aumentando o nível de segurança dos alimentos (GERMANO; GERMANO, 2003).

O processo de radurização reduz o número de microrganismos para estender a vida útil e melhorar qualidade sanitária. O tratamento em peixe, 2-3 kGy reduz o crescimento dos seguintes microrganismos: *Pseudomonas* spp., *Achromobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Proteus* spp., *Flavobacterium* spp. e *Aeromonas* spp., sendo que depois do tratamento, a microbiota do peixe fica reduzida a *Achromobacter* spp., *Micrococcus* spp. e *Proteus* spp. (MASSAGUER, 2005).

As formas esporuladas são mais resistentes a radiação que as vegetativas. Os Gram negativos, como *Pseudomona* spp., *Vibrio* spp., *Proteus* spp., *Aeromonas* spp. e *Serratia* spp. são muito sensíveis e podem ser destruídas com dose entre 1 e 3 kGy. Enquanto que *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Shigela* spp. requerem doses mais elevadas. Os Gram positivos têm radiosensibilidade variável (MASSAGUER, 2005).

Pillai (1980) estimou quantitativamente a microbiota de *Perna indica* nos bancos naturais e fazendas marinhas de Vizhinjam, Índia. Foram encontrados nos animais em ordem decrescente: coliformes fecais, *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Vibrio* spp. Sivalingam e Rajagopalan (1981) pesquisaram a microbiota existente no mexilhão *Perna viridis*. Os autores isolaram sete colônias microbianas, sendo que a abundância relativa destes organismos, em ordem crescente foi *Escherichia* spp., *Shigella* spp., *Aerobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Serratia* spp.

Lewis, Loutit e Austin (1986) pesquisaram, por dezesseis meses, algumas enterovirose de origem humana, no mexilhão *Perna canaliculus* e no sedimento marinho em regiões próximas à descarga de esgoto doméstico na Costa de Taranaki Norte, Nova Zelândia. Os autores mostraram que esses patógenos estão presentes tanto nos animais como no sedimento e que o tempo de depuração natural dessa carga microbiana depende diretamente das condições oceanográficas.

Setyobudiandi et al. (1999) estudaram os indicadores bacterianos no mexilhão *Perna viridis* provenientes do ambiente natural, na Indonésia. Foram identificados *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Vibrio* spp. e *Salmonella* spp. Os resultados

indicaram uma maior contaminação no tecido mole dos animais do que na água do mar, demonstrando que os mexilhões são eficientes bioindicadores bacteriológicos.

Rubião (2008) afirmou que o monitoramento da prevalência das espécies bacterianas clinicamente relevantes em frutos do mar se faz importante na prevenção da veiculação de enfermidades alimentares. Além disto, a elucidação completa do impacto das condições climáticas e das correntes marinhas na prevalência de cepas patogênicas no ambiente é um fator determinante para indicar a presença destas nos alimentos.

2.3.1 *Staphylococcus coagulase positiva*

Bactérias pertencentes à família Staphylococaceae. Cocos, Gram-positivos, não formadoras de esporos e imóveis. Podem se apresentar isolados, em grupos de duas, de quatro ou, mais comumente em grupos maiores em forma de “cachos de uva”. Anaeróbios facultativos com maior crescimento em aerobiose ((FRANCO; LANGRAF, 1996).

São mesofílicas, podendo crescer em temperaturas entre 7 e 48°C, sendo a temperatura ótima de 37 °C. Crescem em faixa de pH entre 4,0 e 9,3, com faixa de pH ótima entre 7,0 e 7,5. A atividade de água mínima necessária para é 0.83 (WHO,2008). Estas bactérias são halotolerantes, podendo resistir a concentrações de 10 a 20% de NaCl presente em alimentos (FRANCO; LANGRAF, 1996). Produzem enterotoxinas (também produzidas por *S. intermedius* e *S. hyicus*) em temperaturas entre 10 e 46 °C, com ótimo entre 40 e 45 °C. Esta produção é mínima em pH menor que 6 e nula em atividade de água menor que 0,86. (WHO, 2008).

O gênero *Staphylococcus* é composto por 31 espécies e 17 sub-espécies, as espécies que se destacam como patógenos potenciais são *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e várias espécies de *S. hyicus*, sendo *S. aureus* a mais importante (VIEIRA, 2004).

Os estafilococos são divididos em duas categorias, coagulase positivos e coagulase negativos, que se baseia na capacidade de coagular o plasma. Esta propriedade é importante marcador de patogenicidade (VIEIRA, 2004).

Tem como habitat o ar, a poeira, o esgoto, a água, o leite e os alimentos, as superfícies expostas ao ambiente, os seres humanos e os animais. O homem e os animais são os principais reservatórios (FORSYTHE, 2002). Na água do mar a estabilidade do gênero e a habilidade de adaptação a diferentes ambientes ainda não se encontra bem definidos (VIEIRA, 2004).

A presença de *S. aureus* no ambiente marinho tem sido relacionada ao número de banhistas, podendo ser considerado um indicador de poluição causada pelo homem (VIEIRA, 2004).

O *Staphylococcus* spp. não são bons competidores com outras bactérias, assim, raramente causa doença alimentar após ingestão de produtos crus. O organismo é inativado rapidamente pelo calor, mas é resistente a secagem e tolerante a altas concentrações de sal (FORSYTHE, 2002).

S. aureus crescem em meios sem sal, porém são capazes de se multiplicar em concentrações de 7 a 10% de NaCl e algumas linhagens podem crescer até 20% de NaCl, dependendo de outros parâmetros como temperatura, pH, atividade de água (a_w) e potencial de oxi-redução (Eh). Em relação ao pH, o *S. aureus* pode se multiplicar na faixa entre 4,0 e 9,8, sendo ótima entre 6,0 e 7,0. Em adicional, os estafilococos são organismos capazes de crescer em valores de a_w menores do que outras bactérias não halofílicas chegando a valores de 0,83 em condições ideais (JAY, 2005). As enterotoxinas podem ser produzidas na faixa de temperatura entre 10 a 46°C (VIEIRA, 2004).

Apresenta resistência ao estresse ambiental, fator que potencializa sua patogenicidade e possibilita sua sobrevivência em alimentos de origem marinha (BEIRÃO et al., 2000).

A gastroenterite estafilocócica pela ingestão de alimentos que contenham enterotoxinas que são produzidas apenas por algumas espécies de estafilococos que geralmente são coagulase e termonuclease positivos. O gênero *Staphylococcus* inclui mais de 30 espécies, sendo 18 espécies de interesse em alimentos. Destas somente seis são coagulase positivas e geralmente produzem nuclease termoestável (JAY, 2005).

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma das intoxicações alimentares mais frequentes. É decorrente da ingestão de enterotoxinas pré-formadas no alimento contaminado pela bactéria. Quando o alimento está contaminado pela

bactéria se ficar sem refrigeração adequada há o crescimento microbiano com produção de toxinas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Os sintomas consistem em náuseas, vômitos, diarreias, dores abdominais, dor de cabeça, sudorese, prostração e sede aparecem geralmente dentro de quatro horas após ingestão de alimento contaminado (JAY, 2005; RIEDEL, 1992; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). O vômito geralmente vem primeiro que a diarreia (VIEIRA, 2004). O quadro clínico normalmente é de curta duração (média de 24h), podendo se estender por até três dias, quando o período de incubação é curto. O restabelecimento é rápido (um a cinco dias), em geral, e a mortalidade é baixa (RIEDEL, 1992).

Os estafilococos não competem bem com a flora normal da maioria dos alimentos. Em temperaturas que favorecem o crescimento dessas bactérias, a biota saprofítica normal do alimento é antagonista por competição nutricional ou modificação do meio (JAY, 2005).

Os fatores mais frequentemente associados a surtos por ingestão de alimento contaminado por enterotoxinas são: refrigeração inadequada, alimento preparado com muita antecedência, falhas na higiene de manipuladores infectados, cozimento ou processamento inadequado, alimentos mantidos sob aquecimento em temperaturas que favorecem o crescimento microbiano (JAY, 2005).

Os *Staphylococcus* podem ser destruídos pelo calor, porém sua toxina enterotóxica é termorresistente (RIEDEL, 1992).

Espécies de estafilococos coagulase negativas são capazes de produzir enterotoxinas, mas quando produzem nuclease são termossensíveis. A prática de pesquisa de estafilococos coagulase positiva em alimentos leva a estimativas inferiores da real prevalência de linhagens produtoras de enterotoxinas (JAY, 2005).

No período de 1987 a 1996, a presença de *S. aureus* foi relatada em 958 casos e 43 surtos ocorridos no Japão, envolvendo pescado e frutos do mar Na Inglaterra de 359 surtos de intoxicação alimentar e casos esporádicos por *S. aureus* apenas 7% foi proveniente de pescado (VIEIRA, 2004).

Em Florianópolis, foram analisadas 175 amostras de pescado (60% de carne de molusco) e em 20% foi identificada a presença de *S. aureus* (AYULO et al., 1994)

O diagnóstico das infecções estafilocócicas é feito por exame bacteriológico de esfregaços corados pelo método de Gram, visualizando cocos Gram-positivos isolados ou agrupados em forma de cachos de uva. A diferenciação do *S. aureus* de

outras espécies mais frequentes do gênero pode ser feita por teste de detecção do fator “clumping” e teste de coagulase (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

O padrão exigido pela legislação brasileira (BRASIL, 2001a) é máximo de 10^3 UFC/g de molusco bivalve *in natura*.

Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positivo em amostras de salmão eviscerado e resfriado de comércio varejista de Belo Horizonte nenhuma amostra foi positiva para este microrganismo (DAMASCENO, 2009).

Ostras (*Crassostrea* spp.) foram coletadas em 11 diferentes pontos do litoral do Paraná com destaque para a Baía de Guaratuba totalizando 45 amostras para a realização de análise bacteriológica. Não foi identificada a presença de *S. aureus* nas amostras (FARIA, 2008).

Segundo Jay (2005), a dose D_{10} para eliminação de *S. aureus* é de 0,16 kGy.

Molins (2001), a dose de extinção de *S. aureus* para sépia seca é de 3,0 kGy e para cavala seca e defumada de 5,0 kGy. A dose D_{10} para *S. aureus* varia de 0,42 kGy em aves domésticas a 10°C e 0,86 kGy em carne.

2.3.2 *Salmonella* spp.

A *Samonella* spp. é um importante patógeno que se pode transmitir tanto por humanos como por animais. A *Salmonella* pode ser encontrada em águas marinhas altamente poluídas e o pescado pode ser positivo até 30 dias após a contaminação inicial (MOLINS, 2001).

Salmonella spp. consiste de bastonetes curtos Gram-negativos não formadores de esporos e são fermentadores de glicose produzindo ácido e gás. A maioria das espécies é móvel, com flagelos peritríquos. O gênero pertence à família Enterobacteriaceae. Infetam o homem e a maioria dos animais domésticos e selvagens, e quando estão presentes em ambientes, água potável e alimentos, deve-se a contaminação por fezes de indivíduos portadores. No homem causa gastroenterite e a febre tifóide (FORSYTHE, 2002; JAY, 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae. Bastonetes retos, Gram-negativos, com 0,7 a 1,5 µm de diâmetro e 2,0 a 5,0 µm de comprimento. Não formadoras de esporos e usualmente móveis através de flagelos peritríquios. Anaeróbios facultativos. Geralmente, formam colônias com 2-4 mm de diâmetro (GARRITY, 2005).

São mesofílicas, crescendo em temperaturas de 5 a 47 °C (ótimo: 37 °C). Crescem em pH maior do que 4.9 (*Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi) ou maior do que 4,0 (outras salmonelas causadoras de doenças veiculadas por alimentos). A atividade mínima de água necessária para o seu crescimento é de 0,95 (WHO, 2008).

O gênero *Samonella* está agrupado em apenas duas espécies, *S. enterica* e a *S. bongori* que estão divididos em cinco subespécies sendo mais de 2000 sorovares no total a maioria classificada como *S. entérica* (JAY, 2005).

As salmonelas são bastante resistentes ao calor, á desidratação e se multiplicam em baixas temperaturas (RIEDEL, 1992). A temperatura ótima para crescimento é de 37°C e a mínima é de cerca de 5°C, como não formam esporos são relativamente termossensíveis podendo ser destruídos a 60°C por 15 a 20 min. (FORSYTHE, 2002).

O habitat primário da *Salmonella* spp. é o trato intestinal dos animais, porém pode ser encontrada em outras parte do corpo. Como forma intestinal é excretada nas fezes podendo ser encontrada também em águas principalmente poluídas. Ao consumir água contaminada ou alimento a pessoa infectada novamente elimina bactérias pelas fezes formando um ciclo. Um animal ou pessoa pode ser portador quando excreta frequentemente *Salmonella* spp. Em suas fezes sem apresentar qualquer sinal ou sintomas da doença (JAY, 2005).

Infecções alimentares causadas por *Salmonella* spp. têm o período de incubação longo de 12 a 72 h por se tratar de uma infecção e duração de 1 a 7 dias, os sintomas são diarréia, cólicas intestinais e com certa freqüência, febre, náuseas e vômitos. Náuseas e vômitos não são intensos e frequentemente ausentes. A taxa de mortalidade de salmonelose é menor que 1% (FORSYTHE, 2002; RIEDEL, 1992).

Os programas de saneamento dos moluscos são baseados na presença de organismos indicadores, todavia, em caso de surto por enfermidade causada por

patógenos, faz-se pesquisa de *Salmonella* entre outros microrganismos (CODEX ALIMENTARIUS, 2010a).

Nos Estados Unidos da América, *S. Paratyphi*, *S. Enteritidis* e *S. Typhi* estão associadas a doenças veiculadas por moluscos (VIEIRA, 2004).

Mariscos da costa da Florida apresentaram em 43% das amostras com *Salmonella*, apresentando maior capacidade de reter *S. Typhimurium* do que *E. coli* (JAY, 2005).

Mohamed Hatha e Lakshmanaperumalsamy (1997) analisaram 730 amostras de peixe e 276 de crustáceos em mercado de peixe no sul da Índia e encontraram *Salmonella* em 14,25% das amostras de peixe e 17,39% nas amostras de crustáceo.

Nos Estados Unidos da América em análise de amostra de pescado consumido cru, a taxa de prevalência foi de 1% para ostras, 3,4% para moluscos e 12,2% em peixe cru (VIEIRA, 2004).

No litoral do Paraná, amostras de ostras (*Crassostrea* spp.) foram coletadas em diferentes pontos, não foi identificada a presença de *Salmonella* (FARIA, 2008). Igualmente, estudo em 39 amostras de salmão eviscerada e resfriadas de estabelecimentos varejistas do Município de Belo Horizonte, MG, não se apresentaram positivas para *Salmonella* spp. (DAMASCENO, 2009).

Gil (2010) analisou amostras de sururu e vôngole quando a presença de *Salmonella*, e encontrou incidência da bactéria em 10% das amostras de sururu e em 20% das amostras de vôngole.

Jay (2005) indicou como valor D_{10} de radiação para *Salmonella* spp. e *Salmonella* spp., respectivamente, 0,13 kGy e 0,800 kGy. Enquanto, Massaguer (2005) indica que é necessário uma dose de 4,75 kGy em carnes de frango para reduzir 7 ciclos logaritmos de *Salmonella*.

Molins (2001) indicou como a dose de extinção de *Salmonella* spp. em pescado congelados é de 4,0 a 5,0 kGy e para *Salmonella enteritidis* em ostras vivas é de 2,5 kGy. A dose D_{10} para *Salmonella* spp. varia de acordo com o alimentos e temperatura de conservação de 0,416 a 0,57 kGy.

O padrão da legislação brasileira (BRASIL, 2001a) é ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de amostra para moluscos bivalves *in natura*.

O limite infeccioso indicado pela FAO (1997) é de 10^2 UFC de *Salmonella* spp.

2.3.3 Coliformes totais e coliformes termotolerantes

Coliformes totais e fecais são considerados microrganismos indicadores de contaminação fecal, cuja presença indica a possibilidade de presença de patógenos entéricos (FORSYTHE, 2002).

As enterobactérias são bacilos Gram-negativos, são anaeróbios facultativos, reduzem nitrato a nitrito, fermentam glicose e são oxidase-negativas (FORSYTHE, 2002; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

O grupo de coliformes inclui espécies do gênero *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, e é característico de organismos que crescem no trato gastrointestinal do homem e animais de sangue quente, sua presença indica contaminação fecal (FRANCO, 2002; VIEIRA, 2004). O grupo é capaz de fermentar a lactose com produção de gás quando incubados a 35 - 37°C por 48 h. A presença de coliforme total no alimento não indica, necessariamente, contaminação fecal, pois podem estar presentes no solo ou em vegetais (JAY, 2005).

A presença de bactérias do grupo coliforme em moluscos bivalves é mundialmente detectada, pois as zonas costeiras, locais ideais para reprodução e crescimentos desses animais, geralmente é onde há escoamento de esgoto e desembocadura de rios trazendo contaminantes biológicos entre eles de origem fecal (EPAGRI, 1994).

E. coli é a principal bactéria representante do grupo de coliformes fecais. Por isso, é considerada a indicadora mais específica de contaminação fecal e da eventual presença de organismos patogênicos e pertencentes às enterobactérias. (FRANCO, 2002; VIEIRA, 2004). Pertencentes à família Enterobacteriaceae. Bastonetes retos, Gram-negativos, não formadoras de esporos e usualmente móveis através de flagelos peritríquios. Anaeróbios facultativos (GARRITY, 2005)

Bactérias mesofílicas crescendo de 7 a 10 °C até 50 °C, com crescimento ótimo em 37 °C. A atividade mínima de água necessária para o seu crescimento é igual a 0,95 e a faixa de pH deve se situar entre 4.4 e 8.5 (WHO, 2008).

Por não fazer parte da microbiota do pescado, a presença de *E. coli* está associada à contaminação fecal da água do local de cultivo. Quando presente em peixes e outros organismos marinhos estabelecem-se na sua superfície e trato intestinal (VIEIRA, 2004).

Com medida de controlar o risco é muito importante a identificação e a vigilância de zonas de cultivo e inocuidade dos moluscos bivalves. A identificação, classificação e vigilância dessas áreas é tarefa de autoridades competentes que normalmente utilizam a análise de *E. coli* como indicador de contaminação fecal e identificação de biotoxinas com frequência determinada. Geralmente amostras de água de cultivo e carne de moluscos são monitoradas quanto a número de coliformes totais e fecais, este para determinar o grau de contaminação fecal (CODEX ALIMENTARIUS, 2010a).

E. coli possui a forma de bastonetes retos Gram-negativos, isolados ou em pares, não esporogênico, anaeróbio facultativo e quando móvel possui flagelo peritríquico. A temperatura ótima de crescimento é 37°C, mas são capazes de fermentar lactose mesmo a 44 - 45,5°C (FRANCO; LANDGRAF, 1996; VIEIRA, 2004).

Coliformes totais e coliformes fecais/ *E. coli* são consideradas bactérias indicadoras de contaminação fecal do ambiente pelo Codex Alimentarius, no caso de cultivo de moluscos bivalves, da água onde são cultivados. Este órgão recomenda que seja feita análises periódicas de toda água de cultivo e carne dos moluscos para monitorar a presença dessas bactérias (FAO, 2009).

E. coli pode se manter cultivável em moluscos, porém não em água do mar exposta a luz solar, ocasionando diferença entre contagem bacteriano da água do mar comparada à da carne de molusco. Observam-se com frequência contagens altas de coliformes fecais em moluscos, mesmo quando a contagem na água do mar não indica restrições de coleta de moluscos (VIEIRA, 2004). Sendo assim, a determinação de coliformes de origem fecal na carne do molusco para avaliar a qualidade do produto, apresenta maiores possibilidades como padrão de normatização no cultivo, do que a análise de água (MACHADO et al., 2001).

No Japão ocorreu um surto causado por ingestão de ovas de salmão salgado contaminados por EHEC O157 em 1998; e no mesmo ano nos Estados Unidos da

América foi registrado um surto por EAEC (*E. coli* enteroagregativa) por consumo de camarão (VIEIRA, 2004).

Foi pesquisada a presença de coliformes totais e fecais em amostras de ostras (*Crassostrea* spp.) coletadas em diferentes pontos do litoral do Paraná com destaque para a Baía de Guaratuba. Em todos os pontos foi detectada a presença de coliformes totais em percentual por amostra variando de 100% a 25% entre os pontos, enquanto que só em metade dos pontos foi identificada *E. coli* com percentual por amostra variando entre 67% e 33% (FARIAS, 2008).

Segundo o *Codex Alimentarius* (2010b), moluscos bivalves vivos ou crus têm como padrão microbiológico para *E. coli* de menos de 230 NMP/g. Enquanto o ICMSF (2010) determina um padrão mais rigoroso de no máximo 16 NMP/g

Amostras de sururu e vôngole foram analisadas quanto a quantidade de coliformes totais e fecais presentes nas amostras, os resultados indicaram alta contaminação com a maioria das amostras estando fora do padrão da legislação para coliforme fecal. A contagem de coliformes totais de vôngole foi superior que a de sururu (GIL, 2010).

Amostras de ostras foram analisadas quanto à quantidade de *E. coli* em diferentes pontos e obtiveram valores máximos entre 1176, 276 NMP/g no ponto interno e 413,576 NMP/g no ponto externo da Baía de Guaratuba, PR (FORCELINI, 2009).

Amostras de ostras, proveniente de duas barracas da Praia do Futuro em Fortaleza, foram analisadas quanto à quantificação de coliformes fecais, foram encontrados valores entre <3 e > 110.000 NMP/g (MORELLI, 2003).

Forcelini (2009) observou que a quantidade de *E. coli* nas ostras tende a zero entre 168 e 192 h de depuração ().

Ni e Huang (1985) determinaram o número de coliformes fecais e totais em seis espécies de bivalves marinhos de seis estações de Hong Kong e observaram que existe uma relação íntima entre o número de coliformes fecais na água do mar e nos bivalves. Na mesma espécie de bivalve, o número de coliformes variou de acordo com o nível da maré e com o tamanho do animal.

A dose infectante estimada para *E. coli* é de 10^6 a 10^7 UFC/g (FORSYTHE, 2002)

A dose D_{10} para eliminação de *E. coli* e *E. coli* O157:H7 é de 0,20 kGy e 0,307 kGy, respectivamente segundo Jay (2005).

Siqueira (2001) irradiando tilápia constatou que a dose de 2,2 kGy não foi efetiva para reduzir a carga bacteriana para coliformes fecais

Molins (2001) indica uma dose de 1,5 kGy para extinção de *E. coli* em ostras (*Crassostrea virginica*) e de menor que 2,0 kGy para camarões, em sépia seca este valor aumenta para 3,0 kGy. A dose D_{10} para *E. coli* O157:H7 em carne moída é de 0,241 a 0,307 kGy dependendo da temperatura de conservação.

Marins (2003) analisando o efeito da radiação ionizante em carne de rã observou redução na média dos resultados de coliforme fecal com o aumento da dose de irradiação.

Valente (2004) irradiando amostras de mexilhão com 3, 5 e 7 kGy encontrou diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os irradiados no resultado de NMP de *E. coli*, as médias de NMP/g de mexilhão foram 0,35 log NMP/g para o grupo controle; 0,06 log NMP/g para 3 kGy; 0,04 log NMP/g para 5 kGy e 0 log NMP/g para 7 kGy.

2.3.4 **Vibriose**

Os moluscos bivalves se alimentam pela filtração de água em área circulantes, onde os víbrios podem se proliferar e conseqüentemente concentrar-se em seus tecidos. Quando uma pessoa ingere frutos do mar crus ou mal cozidos, as bactérias atingem o tubo digestivo e se multiplicam rapidamente (FDA, 2008).

O ambiente marinho é habitat natural do *V. parahaemolyticus*. Como reservatório nos meses frios pode ser encontrado no lodo marinho e nos meses quentes, livremente na água do mar ou peixes e moluscos. O período de incubação varia entre 12 e 24 h após a ingestão de alimentos contaminados, podendo os sintomas iniciar entre 4 a 30 h de ingestão (CVE, 2008).

Bactérias pertencentes à família Vibrionaceae. Bastonetes polimórficos curtos, retos ou curvos em formato de vírgula. Gram-negativos (as formas jovens muitas vezes se coram de maneira bipolar). Não formam esporos e são móveis

graças a um flagelo polar, apresentando flagelos laterais após cultura em meio sólido. Encapsuladas. Não luminescentes. Anaeróbios facultativos capazes de ambos os metabolismos: respiratório e fermentativo (EUZEBY, 2005).

São mesofílicas, podendo crescer em temperaturas entre 10 e 42°C. A temperatura ótima para o seu crescimento é de 37 °C, na qual o tempo de geração é de aproximadamente 10 minutos. Crescem em faixa de pH entre 6 e 11, sendo o pH ótimo igual a 7,6. A atividade de água mínima necessária para é 0.94. São halofílicas, necessitando de um mínimo de 0,4% de NaCl para o seu crescimento que ocorre em concentrações de até 8 % deste sal no meio de cultivo (EUZEBY, 2005; WHO, 2008;).

Vibrio parahaemolyticus e *V. cholerae* O1 são as principais espécies de vibrios causadores de infecções relacionadas ao consumo de pescado, principalmente moluscos bivalves (GONZALEZ, 2005).

O *Vibrio parahaemolyticus* é comum em águas oceânicas e costeiras. A sua detecção está relacionada com a temperatura da água, e o organismo não é detectável até que a temperatura da água atinja aproximadamente 19 a 20°C. Em águas oceânicas, eles tendem a estar associados com moluscos e sua infecção por consumo de moluscos bivalves crus, principalmente (FAO, 1997; JAY, 2005).

Cepas patogênicas de *V. parahaemolyticus* são capazes de produzir reação hemolítica característica denominada como fenômeno de Kanagawa. Casos esporádicos e surtos têm sido registrados no Japão, Sul da Ásia e Estados Unidos, ocorrendo principalmente nos meses quentes (CVE, 2008).

No Recife, casos de diarreia humana foram associados ao consumo de mariscos e peixes contaminados por *V. parahaemolyticus* (MAGALHÃES et al., 1991).

O *Vibrio cholerae* é a causador da cólera epidêmica. No Brasil teve a primeira epidemia no período de 1855 a 1856, durante a terceira pandemia, caracterizada por uma elevada mortalidade principalmente na Região Nordeste. A temperatura para a multiplicação da bactéria está entre 10° a 40°C sendo a ótima para 30°C e é muito sensível ao calor. Crescem rapidamente em frutos-do-mar em temperatura ambiente. Na água do mar pode permanecer viável por 13 dias à temperatura ambiente (SOUSA, 2004).

A ingestão de mariscos crus ou cozidos contaminados com *V. vulnificus* pode levar à septicemia primária ou gastroenterite e infecção por contaminação de ferimentos em pessoas que tiveram contato com a água marinha contaminada. Pode ser encontrado em ambiente marinho com temperatura entre 13°C e 30°C. Sua infecção causando septicemia ou gastroenterite é principalmente associada ao consumo de frutos-do-mar crus contaminados (NASCIMENTO; VIEIRA, 2004).

As vibrioses estão, principalmente, relacionadas a ingestão de frutos do mar crus ou mal cozidos, em destaque moluscos bivalves (CVE, 2008; FAO, 2008).

A maior parte dos vibrios é de origem marinha e necessita de sódio (Na⁺) para se desenvolver. O gênero inclui espécies patogênicas para o homem, como por exemplo, *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae*. As doenças associadas aos *Vibrio* spp. são caracterizadas por sintomas de gastroenterite, desde diarreia moderada a cólera clássica, com exceção para o *V. vulnificus* principalmente associado a septicemias (FAO, 2008).

No Brasil, há relatos de casos de infecção por *Vibrio* não colérico decorrente de ingestão de ostras e outros frutos do mar nas regiões Nordeste e Sudeste, sendo de especial atenção o *V. vulnificus* (ARAÚJO et al., 2007).

Um informativo foi desenvolvido pelo “Food and Drug Administration” (FDA) com o objetivo de ajudar educadores sanitários locais a instruírem a comunidade hispânica sobre os perigos de se comer ostras cruas. Estas ostras podem estar contaminadas com a bactéria *Vibrio vulnificus* que pode causar doenças graves e até mesmo a morte. O informativo inclui: uma nota para a imprensa sobre o lançamento da campanha, uma página informativa, um artigo de jornal, receitas, anúncios no serviço público de rádio, entre outros (INFOALIMENTOS, 2004).

O *Vibrio vulnificus* é encontrado em ambientes marinhos e estuarinos. E sua transmissão pode ocorrer através de ingestão de mariscos crus ou mal cozidos, principalmente ostras cultivadas em ambientes de águas temperadas e tropicais (CDC, 2008; CVE, 2008; FAO, 2008; FDA, 2008; FORSYTHE, 2002). Esta espécie se encontra em concentrações mais altas durante os meses de verão quando a água está mais quente, por serem microrganismos mesófilos (CVE, 2008; FAO, 2008; FDA, 2008). Este organismo é isolado com maior frequência em moluscos bivalves do que em crustáceos (JAY, 2005).

A mortalidade associada à infecção por *Vibrio vulnificus* é superior a 50% dos casos (ARAÚJO et al., 2007). Pessoas infectadas com *V. vulnificus*, quando possuem alguma enfermidade no fígado, correm risco quase 200 vezes maior de mortalidade (ARAÚJO et al., 2007; FDA, 2008). Nos Estados Unidos esta taxa chegou a 95% das mortes relacionadas com frutos do mar (FORSYTHE, 2002).

Em 1996, na cidade de Los Angeles, o *V. vulnificus* fez 16 vítimas tendo como consequência três mortes após o consumo de ostras cruas contaminadas. No período entre 1981 e 1994, 80% dos pacientes com gastroenterites associadas às ostras e 49% dos casos com complicação em óbito foram veiculados a contaminação por *V. vulnificus* (JAY, 2005).

Os sintomas típicos da doença alimentar por infecção por *V. vulnificus* são febre, tremores, náuseas e lesões de pele. O início dos sintomas ocorre cerca de 24h após a ingestão de frutos do mar crus contaminados, principalmente ostras. Os indivíduos mais sensíveis além dos com enfermidades no fígado, imunodeprimidos e idosos. Este difere dos outros vibrios patogênicos por invadir e se multiplicar na corrente sanguínea de maneira altamente invasiva (FORSYTHE, 2002).

Os mariscos podem transmitir a infecção por *Vibrio cholerae*. Este patógeno não se encontra, geralmente, na natureza, exceto quando aparecem os surtos da enfermidade. É provável que os mariscos vivos ou suas carnes contaminadas possam ser veiculadores do agente durante o transporte, pois o exsudato dos mariscos armazenados é rico em matéria orgânica e permite a proliferação do patógeno quando a temperatura está muito elevada. Por se tratar de doença altamente contagiosa, o marisco deve ser proibido para consumo. Para impedir a contaminação e proliferação do agente se fazem necessários o tratamento térmico e embalagem em recipientes esterilizados dentro de procedimentos de extremo cuidado (WOOD, 1979).

O quarto surto de gastroenterite causado por *V. cholerae* ocorreu na Flórida, em 1979, quando 11 pessoas se infectaram ao comerem ostras cruas contaminadas. Oito pessoas tiveram diarreia nas 48h após ingestão e outras três desenvolveram sintomatologia antes deste tempo (JAY, 2005).

A cólera é uma doença infecciosa aguda e grave, que pode levar a óbito. O período de incubação da doença é de 1 a 3 dias após a ingestão do alimento contaminado. Quando atinge o intestino a bactéria se multiplica rapidamente

liberando toxina. Esta toxina levará a diarreia aquosa, profusa e incontrolável e conseqüentemente, perda retal de água e eletrólitos causando desidratação. Outros sintomas encontrados são vômitos, câibras musculares pelo baixo nível de potássio sanguíneo, sede, debilidade, letargia e sinais de hipotensão (SOUSA, 2004).

O *Vibrio parahaemolyticus* é encontrado naturalmente no meio marinho e ocorre nos sedimentos, na água, nos invertebrados e nos pescados, de modo geral. A intoxicação aparece quando os mariscos são processados sob condições higiênico-sanitárias precárias, permitindo a proliferação do agente (WOOD, 1979).

V. parahaemolyticus é uma bactéria Gram-negativa em forma de bastonetes curtos, possui mobilidade pela presença de flagelo polar. É anaeróbio facultativo. Seu crescimento ocorre melhor em pH alcalino entre 7,5 e 8,5 e temperatura ótima de 35 a 37°C. Apresenta halofilismo restrito, exigindo um mínimo de 1% de cloreto de sódio e tolerando o máximo de 8% de sal para o crescimento, porém a concentração mais favorável é 2 a 4% de NaCl (VIEIRA, 2004).

A FAO (1997) indica como condições ótimas para o crescimento de *V. parahaemolyticus*, temperatura de 37°C e mínima de 5°C, pH mínimo de 4,8 e salinidade de 8 a 10‰.

No Japão, o *V. parahaemolyticus* é o maior causador de gastroenterites de origem alimentar. O período de incubação é de 4 a 96 h e dura em média cerca de 3 dias (FORSYTHE, 2002).

As gastroenterites produzidas por *V. parahaemolyticus* são contraídas quase que exclusivamente por alimentação de frutos do mar contaminados (JAY, 2005). As ostras são apontadas como um dos principais veículos de contaminação por *V. parahaemolyticus*, por serem filtradoras podem acumular grande quantidade do microrganismo, e quando consumidas cruas, representam um risco potencial para a saúde (SOUSA, 2004).

Os sintomas mais comuns associados a infecção por *V. parahaemolyticus* são: diarreia, câibras abdominais, náusea, vômito, cefaléia, febre e calafrios (VIEIRA, 2004).

O *V. parahaemolyticus* está presente, normalmente, em quantidade inferior a 10^3 UFC/g em peixes e frutos do mar, exceto em águas mornas, onde a contagem pode aumentar para 10^6 UFC/g. A dose infectante estimada desta espécie é de 10^6 a 10^9 UFC/g (FORSYTHE, 2002).

Recentemente, foi confirmada a primeira vítima fatal por consumo de mariscos crus contaminado por *Vibrio parahaemolyticus* no Chile (EMOL, 2008).

Em 1998, o *V. parahaemolyticus* foi o agente etiológico de um surto envolvendo 23 pessoas que morava em Nova Jersey e Nova York, as quais se alimentaram com ostras cruas e moluscos provenientes de Long Island Sound, Nova York. No ano de 1997, em Washington, Oregon e Califórnia, o *V. parahaemolyticus* fez 209 vítimas decorrente da ingestão de ostras cruas contaminadas (JAY, 2005).

Matté et al. (1994) ao estudarem a distribuição de *Vibrio* em ostras provenientes do Estado de São Paulo encontraram predomínio de *V. parahaemolyticus* em 77% das cepas identificadas.

Em estudo investigativo com ostras (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas *in natura* em restaurantes da cidade do Rio de Janeiro, foram identificadas oito diferentes espécies de *Vibrio*, apresentando uma alta prevalência do *V. parahaemolyticus* (45%) e uma considerável presença de *V. vulnificus* tornando este fato preocupante tanto para os consumidores deste alimento como para os comerciantes e distribuidores desta cadeia produtiva (PEREIRA et al., 2007a). Pesquisa semelhante realizada com coletas em duas barracas de praia em Fortaleza no decorrer de um ano detectou a contaminação das amostras de ostra de 54% para *V. parahaemolyticus*; e em menor grau para *V. vulnificus* (BARROS et al., 2007).

Foram coletadas do estuário do Rio Cocó em Fortaleza, 12 amostras de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, 4 amostras foram positivas para *V. cholerae* e apenas uma foi positiva para *V. parahaemolyticus* (SOUSA et al., 2004).

Pesquisa de *V. parahaemolyticus* realizada em 86 amostras de mexilhão (*Perna perna*) *in natura* e pré-cozidas coletadas em Jurujuba, Niterói, RJ; totalizando presença da bactéria em 11,6% das amostras analisadas. A maior parte das cepas isoladas (64,7%) foi encontrada em mexilhões *in natura*, porém a presença em amostras pré-cozidas é relevante, pois indica que o cozimento não foi efetivo (PEREIRA et al., 2007b).

Em análise da qualidade microbiológica de ostras (*Crassostrea gigas*) produzidas e comercializadas em Florianópolis, foi detectada a presença de *Salmonella* spp., *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus* em nove das 90 amostras coletadas (PEREIRA et al., 2006).

Ostras (*Crassostrea rhizophorae*) *in natura* em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural das cidade do Rio de Janeiro e Niterói, RJ, respectivamente, apresentaram presença significativa de *V. parahaemolyticus* identificados por Pereira et al. (2004). No Município de Palhoça, Santa Catarina, também foi detectada a ocorrência de *V. parahaemolyticus* em mexilhão (*Perna perna*) em um alto percentual (52,5%) das amostras coletadas em condições ambientais média de 25,4°C e 35,6% de salinidade (A RCHER; MORETTO, 1994).

Pesquisa realizada em ostras de Grays Harbor, Washington, nos Estados Unidos da América detectou contaminação por *V. parahaemolyticus* em 100% das amostras analisadas (KAYSNER et al., 1990).

Na legislação brasileira (BRASIL, 2001a) não há um padrão de limite de crescimento para este tipo de microrganismo em moluscos bivalves *in natura*, apesar da infecção pelo mesmo estar altamente associada ao consumo deste alimento. Enquanto que a regulamentação da FAO (1997) consta como dose infecciosa mínima para *V. parahaemolyticus* 10⁶ UFC/g de pescado.

O uso da irradiação de pescado visa reduzir para níveis considerados seguros, do ponto de vista microbiológico, as populações de *Vibrio parahaemolyticus* e *V. vulnificus* em ostras e mariscos vivos que são freqüentemente consumidos crus (LANDGRAF, 2008).

A dose de radiação efetiva para eliminação do gênero *Vibrio* estaria na faixa entre 1,5 a 2,0 kGy (IAEA, 2001). Segundo Moraes et al. (2000), a dose de 1,41 kGy é suficiente para a eliminação de *Vibrio cholerae* O1; para Jakabi (2001) basta uma dose de 1,0 kGy para a mortalidade do *V. parahaemolyticus*.

Molins (2001) afirma que a dose de extinção para *Vibrio parahaemolyticus* em ostra (*Crassostrea virginica*) é de 1,0 kGy e para camarão do Golfo do México inoculado com a bactéria é de 0,3 kGy; e a dose D₁₀ em camarão congelado é de 0,1 kGy.

3. METODOLOGIA

3.1 COLETA, PREPARAÇÃO E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS

As amostras de mexilhão, *Perna perna*, foram provenientes de cinco pontos estratégicos de cultivo de moluscos bivalves na Baía de Ilha Grande, seguindo a metodologia de coleta utilizada pelo Setor de Pesca da Secretaria de Atividades Econômicas da Prefeitura Municipal de Angra dos Reis. Este município vem empregando há aproximadamente um ano este tipo de coleta com o molusco bivalve vieira (*Nodipecten nodosus*) e com a água do mar visando o monitoramento ambiental e da maricultura, que tem esta espécie como a mais utilizada para a produção na região.

Os pontos selecionados na Baía de Ilha Grande foram: Praia de Araçatiba (A), Praia de Tapera (B), Praia de Passa Terra (C), Praia de Castelhanos (D), todos localizados em Ilha Grande; e Praia de Maciés (E) localizado no continente (Figura 2).

Cada coleta realizada nos pontos foi composta no mínimo de 60 animais adultos vivos, machos e fêmeas, segundo instruções de coleta da APHA (APHA, 2001) a fim de atingir o volume de carne e do líquido palial necessário para a análise de moluscos bivalves. Para este plano amostral, foi considerada uma amostra indicativa de cada ponto.

As amostras vivas foram acondicionadas em diferentes caixas isotérmicas para transporte identificadas em meio à água do mar de onde foram coletadas. As

mesmas foram levadas para o Laboratório de Instrumentação Nuclear do Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – LIN-COPPE/UFRJ para o procedimento da irradiação.



Figura 2: Imagem de satélite da Baía de Ilha Grande com os pontos de coletas “plotados”. Adaptado de Google Earth (2010).

3.1.1 Parâmetros físico-químicos dos pontos de coleta

No momento da coleta das amostras, foram determinadas salinidade, temperatura e pH da água do mar dos pontos amostrais através de sonda marca Hanna, modelo HI 9828.

3.2 IRRADIAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os mexilhões coletados foram encaminhados ao Laboratório de Instrumentação Nuclear da COPPE/UFRJ armazenados em caixas isotérmicas contendo água do mar do ponto onde foram retirados. As amostras chegaram vivas ao laboratório e em perfeito estado. De cada ponto de coleta foram separados de maneira aleatória 20 exemplares de mexilhão *Perna perna* para cada amostra: controle, irradiado a 1,0 kGy e irradiado a 1,5 kGy. Essas amostras foram colocadas em embalagens de polietileno previamente identificadas. Foram ainda identificadas com etiquetas de cores diferentes (branca – controle, amarela – 1,0 kGy e laranja – 1,5 kGy) contendo a letra correspondendo ao ponto de coleta (A – Araçatiba, B – Tapera, C – Passa Terra, D – Castelhanos e E – Maciés). Essas embalagens foram depositadas em caixa de poliestireno expandido contendo bolsas de gelo mantendo a temperatura amena.

Para a irradiação das amostras foi utilizado o irradiador marca MDS Nordion, modelo Gammacell/ 220 Excel que utiliza uma fonte de radiação gama de cobalto 60.

A taxa de dose da fonte no dia da irradiação era de 31,56 Gy/min. Assim sendo, para a dose de 1,0 kGy, as amostras foram expostas por 31 minutos e 40 segundos a radiação e, para a dose de 1,5 kGy, irradiadas por 47 min e 30 segundos.

Para o processo de irradiação as embalagens com as amostras foram acondicionadas dentro em Becker de 2 L e feito um cinturão eletrônico de acrílico em torno para garantir uma irradiação efetiva.

Imediatamente após a irradiação das amostras, estas foram transportadas para o Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense/UFF para a realização das análises.

3.3 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

Os grupos das amostras irradiadas e o controle retornaram para a realização das análises bacteriológicas de maneira asséptica. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Controle Microbiológico de POA/UFF seguindo a recomendação da resolução RDC nº 12 da ANVISA para amostras representativas de moluscos bivalves *in natura* (BRASIL, 2001a) e seguindo a metodologia da IN nº 62 (BRASIL, 2003) (Figura.3).

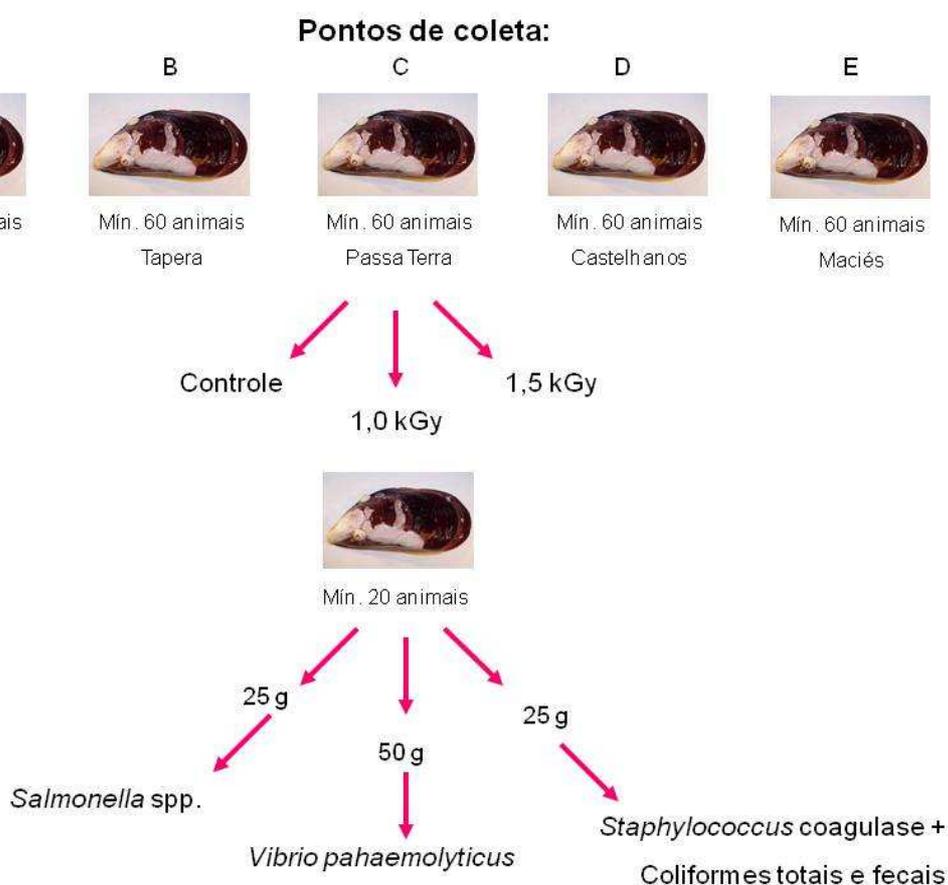


Figura 3: Representação de plano amostral, amostra representativa e unidade amostral das análises realizadas.

Além das análises recomendadas pela resolução da ANVISA supracitada foram realizados números mais prováveis de *Vibrio parahaemolyticus* e coliformes totais e fecais.

Todo o procedimento laboratorial foi realizado de maneira asséptica.

3.3.1 Abertura dos mexilhões

A maioria dos animais ainda estava viva. Apenas poucos exemplares que foram submetidos à irradiação encontravam-se mortos ou fragilizados no momento da abertura.

A abertura dos animais foi realizada em área de segurança da chama do bico de Bunsen em câmara assépticas com auxílio de instrumental cirúrgico. O material usado na abertura era esterilizado em chama do bico de Bunsen. O bisso foi retirado para não entrar em contato com o conteúdo das conchas.

Os mexilhões após a retirada das valvas foram fragmentados e realizada a pesagem das unidades amostrais em balança semi-analítica.

3.3.2 Contagem de *Staphylococcus Coagulase Positiva*

Para a contagem de *Staphylococcus Coagulase Positiva* adotou-se a técnica preconizada pela IN nº 62 (BRASIL, 2003) para alimentos de origem animal e amostras diluídas através de técnica de miniaturização (FRANCO; LEITE, 2005) (Figura 4).

Foram retiradas, homogênea e aleatoriamente, 25 g de cada amostra. De maneira asséptica, a porção foi transferida para um envelope de polietileno esterilizado por processo de irradiação. A unidade analítica foi homogeneizada em 225 mL de solução salina peptonada a 0,1%, necessário para obter-se a diluição inicial (1:10) com auxílio de “Stomacher”® em velocidade média por dois minutos.

As diluições por miniaturização de cada amostra foram realizadas pela transferência, com auxílio de pipeta automática, de 100 µL, homogeneizada, em

microtubos tipo "ependorf", estéreis e contendo 900 μL de mesma solução diluente, produzindo a segunda diluição (10^{-2}). As diluições subsequentes foram obtidas da mesma maneira, transferindo 100 μL da diluição 10^{-5} (FRANCO; LEITE, 2005).

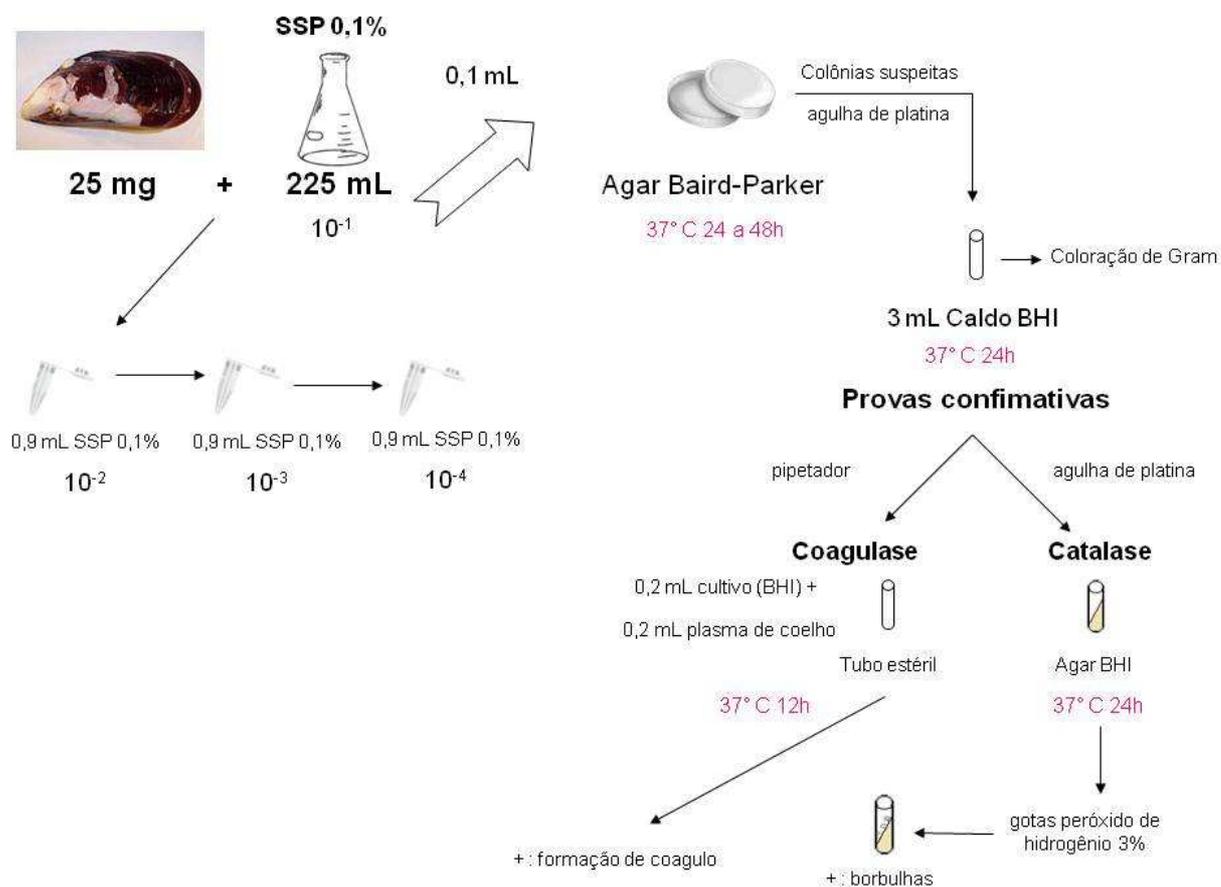


Figura 4: Representação esquemática da análise de Contagem de *Staphylococcus* Coagulase Positiva.

Semeou-se, com auxílio de bastão tipo "hockey", uma alíquota de 100 μL em superfície de placa de Petri com ágar Baird-Parker (HIMEDIA® M043-500G) das diluições 10^{-1} e 10^{-4} em duplicata. As placas foram incubadas invertidas em estufa bacteriológicas a 37°C por 48 h.

O *Staphylococcus aureus* tem a capacidade de reduzir o telurito de potássio formando colônias pretas e por ação proteolítica e lipolítica digerir a gema do ovo formando um halo de transparência ao seu redor.

As colônias suspeitas, depois de enumeradas, foram repicadas com o auxílio de uma agulha de platina para o Meio Infusão Cérebro Coração (Caldo BHI) (HIMEDIA® M210-500G) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas

para obtenção de cultivos jovens (fase log), com o máximo de potencial imunogênico e patogênico, para realização das provas confirmativas: prova da coagulase e prova da catalase .

Previamente foi procedida a coloração da lâmina pelo método de Gram através de uma alíquota retirado por alça do cultivo em BHI. Esta prova baseia-se na verificação das características morfológicas e tintoriais do microrganismo evitando falsos positivos nas outras provas complementares. *Staphylococcus* coagulase positiva apresentam-se como coco Gram positivos.

Para a prova da catalase, com o auxílio de uma alça de platina foi retirada uma alíquota do cultivo em Caldo BHI recém incubado para o Ágar “Brain Heart Infusion” (Ágar BHI - nutriente) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. No tubo com o cultivo em Ágar BHI foram colocadas algumas gotas de peróxido de hidrogênio 3% com auxílio da pipeta Pasteur. *Staphylococcus* coagulase positiva possui a enzima catalase que decompõe o peróxido de hidrogênio com formação instantânea de borbulhas.

A prova da coagulase foi realizada com auxílio de pipetador automático transferindo 200 µL do cultivo em BHI suspeito para tubo estéril e adicionado 200 µL de plasma de coelho (Coagu-plasma LABORCEIN® cod.570204) e incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 12 h .

3.3.3 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Para a pesquisa de *Salmonella* spp. (Figura 5) inicialmente foi realizada uma etapa de pré-enriquecimento. Foi pesada a unidade amostral de 25g em embalagem de polietileno esterilizada através do processo de irradiação e homogeneizada em 225 mL de Água Peptonada 1% Tamponada (APT) no aparelho “Stomacher”® em velocidade média por dois minutos e foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Esta solução por ser tamponada favorece a manutenção do pH, evitando que as bactérias acompanhantes acidifiquem o meio, prejudicando a recuperação das células de *Salmonella* spp.

Com o auxílio do pipetador automático foi transferido 1 mL do cultivo em APT para um tubo com 10 mL de Caldo Tetrionato (CT) (OXOID® CM029) e 100 µL para um tubo com 10 mL de Caldo Rappaport Vassiliadis (CRV) (HIMEDIA® M880-500G). Sendo posteriormente homogêneos e incubados em estufa bacteriológica a 42°C por 30 horas. O enriquecimento seletivo baseia-se na utilização de meios que contêm substâncias de ação inibidoras do crescimento para a maioria dos microrganismos interferentes e na incubação em temperatura seletiva. No CT, a seletividade é conferida pelo tetrionato e pelo verde brilhante e no CRV, a presença de verde malaquita e de cloreto de magnésio.

O material enriquecido nos meios CT e CRV foi semeado por esgotamento em placas de Petri para o isolamento e seleção das colônias suspeitas em pelo menos 2 meios seletivos.

O meio Agar Bile Peptona Lactose Sacarose (BPLS) (VETEC® cod.5054) é obrigatório pela legislação, Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2003). No BPLS a novobiocina inibe o crescimento de *Proteus* sp. e bile bovina e o verde brilhante para microrganismos Gram positivos. O meio Agar Salmonella Diferencial (SD) (HIMEDIA® M1078-500G) individualiza a *Salmonella* pela presença do propilenoglicol e de um cromógeno que evidencia a hidrólise da beta-galactosidase. O Agar Hectoen Entérico (HE) (HIMEDIA® M467-500G) possui dois indicadores, o bromotimol e o ácido fucsínico, que diferencia os microrganismos lactose-positivo dos lactose-negativo pela coloração das colônias. Algumas salmonelas reduzem combinação do tiosulfato de sódio, presente no meio e formam um composto que reage com sal férrico, este é evidenciado pelo indicador ácido sulfídrico (H₂S)-positivo, originando sulfeto de ferro de coloração preta. Os sais biliares são responsáveis pela inibição dos microrganismos acompanhantes.

As placas de Petri com comportamento bioquímico característico para *Salmonella* spp. foram repicadas (três colônias isoladas de cada plaqueamento) para o Ágar Três Açúcares e Ferro (TSI) (HIMEDIA® M021-500G) para a triagem bioquímica das colônias típicas de *Salmonella* spp., na qual utiliza-se meios indicativos não seletivos. Após o repique (picada profunda e estriamento na superfície inclinada do bisel com auxílio de agulha de platina), os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

No Ágar TSI estão presentes: glicose (1 g/L), lactose (10 g/L) e sacarose (10 g/L). Como a glicose é um monossacarídeo e está em baixa concentração, será rapidamente fermentada anaerobiamente, formando ácido no fundo do tubo (viragem da cor do indicador vermelho de fenol para amarelo). A fermentação aeróbia da glicose, que ocorre na superfície do bisel, resulta em ácido pirúvico, que é posteriormente degradado a gás carbônico (CO₂) e água. A grande maioria das salmonelas não fermenta a sacarose e a lactose, não provocando alterações no meio TSI. Como a fonte de carbono utilizável (glicose) é rapidamente esgotada, a salmonela passa a degradar aerobiamente o substrato protéico do meio, produzindo amoníaco (NH₃), o que confere ao meio um pH alcalino, modificando a coloração do bisel para rosa intenso. A maioria das salmonelas apresenta no TSI as seguintes reações: ácido na base, com ou sem produção de gás; alcalino ou inalterado no bisel; e produção de H₂S.

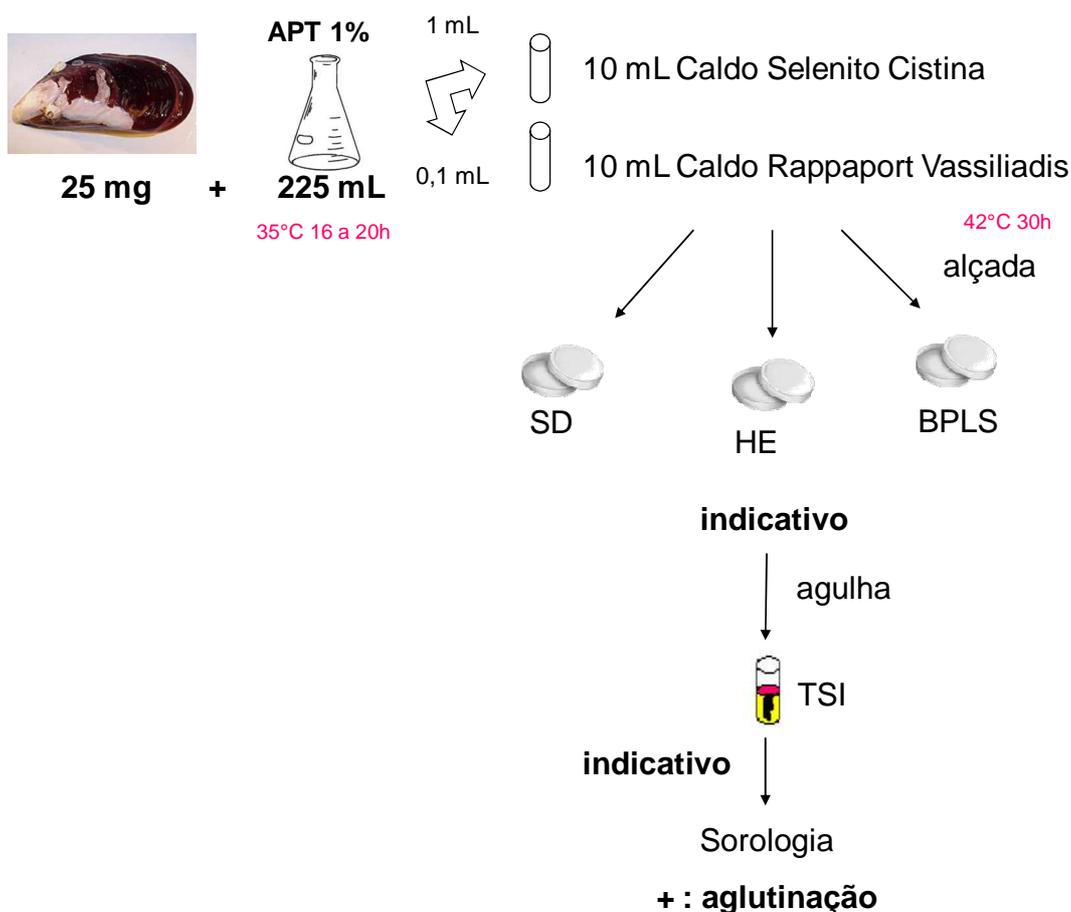


Figura 5: Representação esquemática da presença de *Salmonella* spp.

Para confirmação através da sorologia foi utilizado o Soro *Salmonella* Polivalente (Biored®) que contém anticorpos contra antígenos O das salmonelas dos grupos A, B, C, D e E.

Verificou-se previamente a eficiência do soro somático polivalente realizando o teste de autoaglutinação com uma gota de soro e uma gota de solução salina 0,85%, verificando ausência de aglutinação. Foram consideradas positivas as reações de aglutinação ocorridas no intervalo de dois minutos.

Foi adicionado 200 µL de Solução Fisiológica Estéril 0,85% ao crescimento em TSI com comportamento de *Salmonella* para obtenção de uma suspensão bacteriana espessa. Em uma placa de aglutinação (Huddleson) foi colocado uma gota da suspensão bacteriana (50 µL) juntamente com uma gota padrão do soro somático polivalente. A placa foi movimentada de maneira suave por 2 min. A reação positiva apresenta aglutinação na mistura cultivo e anti-soro.

3.3.4 Enumeração de Coliformes Totais e Fecais

Para a enumeração de Coliformes Totais e Fecais (Figura 6) foi usada a técnica de método rápido. O procedimento de diluição foi o mesmo utilizado para contagem de estafilococos seguindo técnica de miniaturização (FRANCO; LEITE, 2005). Foram utilizadas as diluições de 10^{-1} a 10^{-4} .

Foram retiradas alíquotas de 100 µL da diluição e adicionadas em 1 mL de caldo Rapid Hi-Coliform (HIMEDIA® M1453-500G) (modificação do caldo LMX) em microtubos tipo “eppendorf” previamente esterilizados. Este meio em presença de coliforme apresenta uma coloração verde-azulada pela divisão do substrato cromogênico, a fluorescência em luz UV indica presença de coliformes fecais providos da enzima B-D-glicuronidase. Além de indicar fluorescência em presença da bactéria. Foram inoculadas alíquotas em série de três tubos para cada diluição. Os microtubos tipo “eppendorf” foram incubados a 35°C por 48 horas. A leitura foi realizada no final do período de incubação com auxílio de luz UV. Em caso de fluorescência, as amostras foram para o teste confirmativo para coliforme fecal através do reagente de Kovacs. Quando positivo, houve indicação de viragem de cor

do indol para vermelho do reagente. Os resultados de NMP foram analisados por tabela Mac Crady.

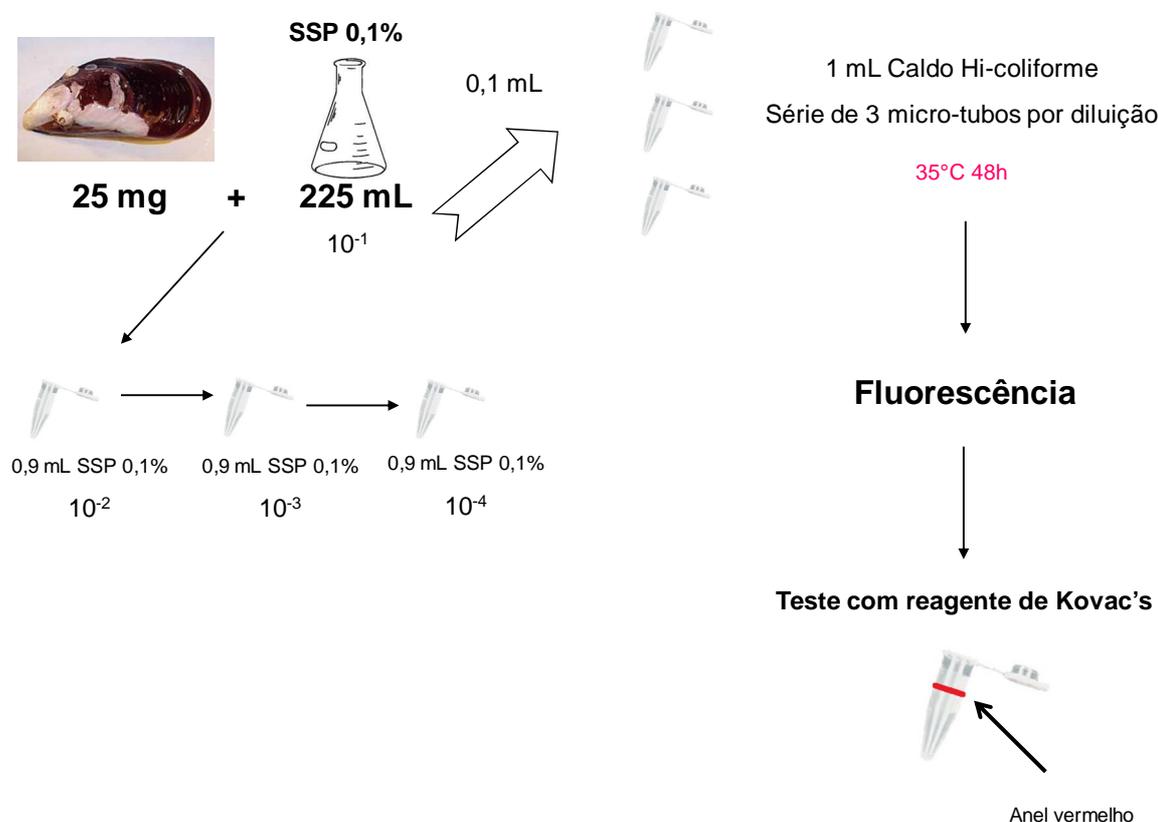


Figura 6: Representação esquemática da enumeração de Coliformes Totais e Fecais.

3.3.5 Número Mais Provável de *Vibrio parahaemolyticus*

Para a enumeração do NMP de *V. parahaemolyticus* (Figura 7) foram retiradas, homogênea e aleatoriamente, 50 g de cada amostra. De maneira asséptica, a porção foi transferida para um envelope de polietileno esterilizado por processo de irradiação. A unidade analítica foi homogeneizada em 450 mL de caldo peptonado sal 3% (CPS3%), necessário para obter-se a diluição inicial (1:10) com auxílio de “Stomacher”® em velocidade média por dois minutos.

As diluições subsequentes foram realizadas pela transferência, com auxílio de pipeta automática, de 1 mL da diluição anterior de maneira homogênea, em tubos contendo 9 mL de mesma solução diluente, produzindo a segunda diluição (10^{-2}). Este procedimento foi realizado até a diluição 10^{-3} .

A partir das diluições realizadas foi inoculado 1 mL em uma série de três tubos contendo 10 mL de Caldo "Glucose Salt Teepol" GSTB (HIMEDIA® M621-500G), caldo de enriquecimento seletivo. Os tubos foram incubados a 36°C por 24h. Os tubos de cada série que apresentaram turvação foram anotados com suspeita de presença de *V. parahaemolyticus*.

De cada GSTB que apresentou turvação foi retirada uma alíquota da superfície do cultivo com auxílio de alça de platina e estriada em Agar tiosulfato citrato sacarose sais biliares (TCBS) (HIMEDIA® M870-500G). As placas foram incubadas invertidas em estufa bacteriológicas a 36°C por 24h. As colônias que se apresentaram arredondadas, opaca com coloração esverdeada, característica de *V. parahaemolyticus* foram repicadas em CPS3% e Agar nutriente sal 3% (ANS3%) e incubados a 36°C por 24h para as provas preliminares para a indicação.

Proveniente do meio ANS3% foi realizada uma lâmina do cultivo e feita a coloração de Gram. Os *Vibrio parahaemolyticus* são bastonetes retos ou curvos.

Do cultivo em CPS3%, foi transferida uma alçada para tubo contendo caldo peptonado sem sal (CPSS) e caldo peptonado sal 8% (CPS8%). O *V. parahaemolyticus* é halofílico restrito, multiplica-se em CPS8% mas não em CPSS.

As demais provas preliminares para identificação não foram realizadas, pois o resultado foi negativo nas primeiras.

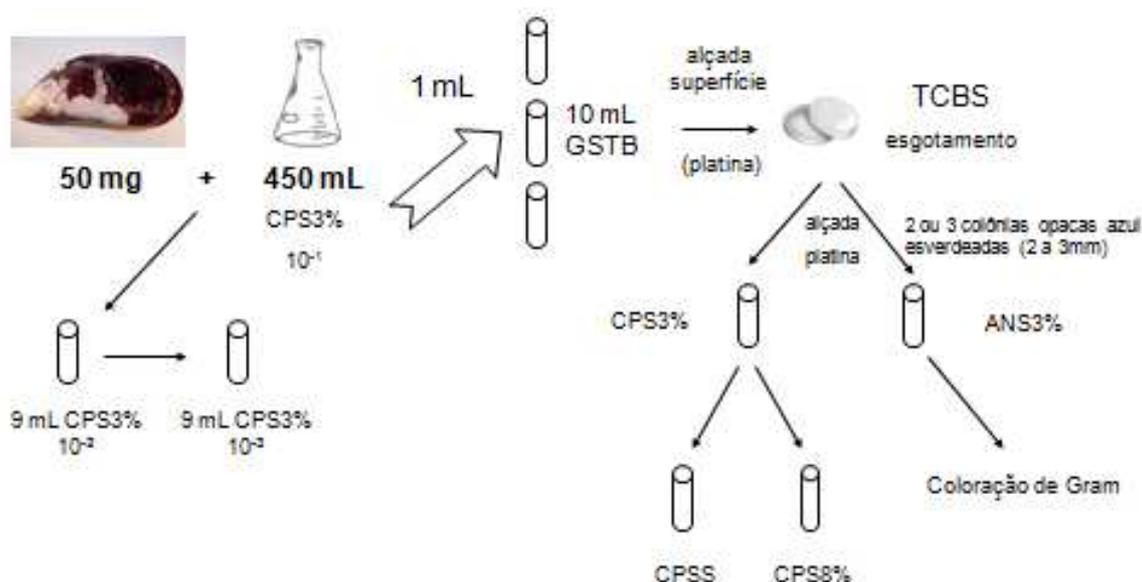


Figura 7: Representação esquemática da análise de NMP de *Vibrio parahaemolyticus*

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados foram descritos estatisticamente por meios paramétricos (média e desvios padrões), tabulares (tabelas estatísticas) e gráficos (gráfico em setores e diagrama de caixa).

Comparações entre proporções binárias foram realizadas por meio do teste binomial.

Comparações entre valores médios das amostras e os valores padrões da legislação foram procedidas pelo teste t de Student.

A Análise da Variância (ANOVA) investigou diferença entre as médias dos três grupos de amostras, complementadas, para as comparações múltiplas entre os grupos, pelo teste de Tukey.

A análise dos dados foi auxiliada por meios computacionais: planilha Microsoft Excel e programa SPSS v.10.0.

As decisões estatísticas foram tomadas ao nível de significância $\alpha = 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A região da Baía de Ilha Grande é uma das maiores produtoras de moluscos bivalves no estado do Rio de Janeiro. A região passou por um período de mortalidade dos animais de cultivo, sem a definição ao certo da causa *mortis*. Supõe-se que este problema sofrido pela maricultura entre os anos de 2009 e 2010 seja devido a alta temperatura da água de cultivo, devido a fenômenos climáticos. Em anos anteriores ocorreu uma mortalidade que suspeita-se tenha sido em decorrência da a contaminação bacteriológica dos locais de cultivo.

Nos anos de 2009 e 2010, o Município de Angra dos Reis passou por período de chuvas que levou até a desastres ambientais como o desabamento de encosta com destruição de casas e mortes.

Na Ilha Grande por ser uma ilha, o saneamento básico da região é precário; e a área é altamente explorada pelo turismo e em algumas praias há locais de alta densidade populacional.

A coleta foi realizada no mês de maio após os desastres ambientais e superaquecimento da água. O ponto de coleta A na praia de Araçatiba foi o que se apresentou mais povoado, os mexilhões estavam muito parasitados. Os pontos B (Tapera) e C (Passa Terra) possuem menor quantidade de habitações comparada ao ponto anterior. O ponto D (Castelhanos) foi o que se apresentou com o mar mais agitado e pouco povoado, os mexilhões possuíam tamanhos maiores. Enquanto que o ponto E (Maciés) região do continente na área de coleta foi observada apenas uma moradia e foi a área de maior quantidade de mexilhões nos espinheis. Passa Terra foi o ponto que apresentou menor quantidade de animais no cultivo.

Considerando que algumas áreas de coleta se apresentaram povoadas e pela falta de saneamento básico na região e a mortalidade dos moluscos apresentada nos últimos anos, estes animais podem ter grande importância em Saúde Coletiva. Como a biota de pescado é reflexo do ambiente onde vivem e principalmente no caso de moluscos bivalves que são organismos filtradores (HENRIQUES, 2004; JAY, 2005; MOLINS, 2001; RODRIGUES, 1998; RODRIGUES-ARIZA et al., 1992). Autores alertam para o perigo do consumo de moluscos bivalves tanto pela qualidade sanitária do ambiente onde vivem como pela maneira de ser consumidos, geralmente crus ou mal cozidos (BEIRÃO et al., 2000; CARDONHA et al., 1994; COOK, 1991; JOSÉ, 1996; ORDÓÑEZ et al., 2005; REICHENHENBACH-KLINKE et al., 1982), o que foi observado nos locais de coleta.

4.1 *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA

As contagens encontradas nas análises de *Staphylococcus* coagulase positiva nos grupos analisados foram relativamente baixas. As amostras Controle apresentaram valores entre 15 e 40 UFC/g de mexilhão, apenas no ponto D (Castelhanos) não houve crescimento da bactéria em questão. Enquanto as amostras irradiadas indicaram ausência em todas, exceto no ponto A (Araçatiba) de coleta na dose de 1,5 kGy que alcançou 20 UFC/g.

O ponto que apresentou maior valor de crescimento microbiano (40 UFC/g) foi o ponto E (Maciés).

As médias dos grupos foram: 21 UFC/g para o grupo controle, 0 UFC/g para o grupo irradiado com 1,0 kGy e 4 UFC/g para o grupo com 1,5 kGy. Consta na Figura 8 a distribuição dos dados segundo os grupos, por meio de um diagrama de caixa (“box plot”).

O padrão preconizado pela legislação, Resolução RDC nº 12 da ANVISA, (BRASIL, 2001a) é máximo de 10^3 UFC/g de molusco bivalve *in natura*. Sendo assim, todas as amostras estavam dentro do padrão, sendo consideradas próprias para consumo.

Comparando as médias por grupo (níveis de radiação 0; 1,0 e 1,5), com controle por ponto de coleta, houve evidência de diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a contagem de *Staphylococcus* dos três grupos. A Tabela da ANOVA (Tabela 1) resume os achados.

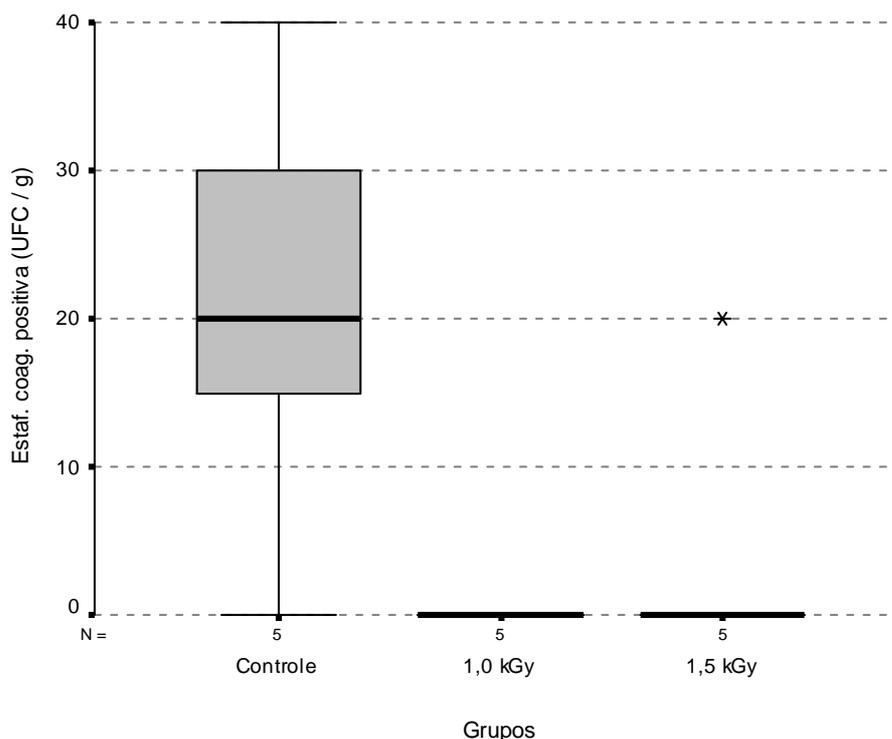


Figura 8: Distribuição da contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva por grupos de análises.

Tabela 1: Descrição da análise de variância (ANOVA) entre os grupos para os resultados de contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva.

Fonte de variação	Soma de quadrados	de Graus de liberdade	Quadrado médio	F ₀	valor-p
Níveis de radiação	1243.3	2	621.7	5.921	0.026
Pontos de coleta	400	4	100		
Resíduos	840	8	105		
Total	2483.3	14			

As comparações múltiplas (entre os Grupos) indicam que o grupo Controle difere significativamente do grupo 1,0 kGy, mas não do grupo 1,5 kGy.

O teste de Tukey, ao nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$) indica existência de diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos Controle e 1,0 kGy ($\Delta = 21$; valor = 0,017), mas não entre os grupos Controle e 1,5 kGy ($\Delta = 17$; valor = 0,052) e entre os grupos 1,0 kGy e 1,5 kGy ($\Delta = - 4$; valor = 0,811).

Vieira (2004) relatou que dos 359 surtos de intoxicação alimentar e casos esporádicos por *S. aureus* ocorridos na Inglaterra, apenas 7% foi proveniente de pescado que é um baixo índice. O presente trabalho corrobora com os dados apresentados por Vieira (2004), pois o resultado de contagem de *Staphylococcus* estava dentro do limite preconizado pela legislação em todas as amostras, ou seja, considerados alimentos seguros de risco de intoxicação por *Staphylococcus* coagulase positivo.

Ayulo e colaboradores (1994) analisaram 175 amostras de pescado (60% de carne de molusco) de Florianópolis e em 20% foi identificada a presença de *S. aureus*. Nesta pesquisa, igualmente a presença *S. coagulase* positivo foi detectada principalmente no grupo controle, 80% das amostras sendo que em baixa contagem.

Enquanto que Damasceno (2009) pesquisando de *Staphylococcus* coagulase positivo em amostras de salmão eviscerado e resfriado de comércio varejista de Belo Horizonte não encontrou amostra positiva para este microrganismo; e Faria (2008) realizou análise bacteriológica de ostra (*Crassostrea* spp.) em diferentes pontos do litoral do Paraná com destaque para a Baía de Guaratuba obteve o mesmo resultado. Esta tendência não foi encontrada no grupo controle de mexilhão do presente trabalho.

Segundo Jay (2005), a dose D_{10} para eliminação de *S. aureus* é de 0,16 kGy. Todavia, Molins (2001), especifica a dose de extinção de *S. aureus* para sépia seca (3,0 kGy) e para cavala seca e defumada (5,0 kGy). A dose D_{10} para *S. aureus* varia de 0,42 kGy em aves domésticas a 10°C e 0,86 kGy em carne. Através dos resultados do presente estudo, afirma-se que a dose de 1,0 kGy seria suficiente para a extinção de *S. coagulase* positivo em mexilhão *in natura*.

4.2 *Salmonella* spp.

Identificou-se 21 colônias com presença de *Salmonella* spp., levando a resultado positivo (presença de *Salmonella* spp.) nas cinco amostras de cada grupo, a uma proporção de 100% das amostras do grupo Controle e 40% das amostras dos dois grupos irradiados (1,0 kGy e 1,5 kGy). Todos os pontos de coleta foram positivos para salmonela no grupo Controle, enquanto que no ponto A (Araçatiba) e B (Tapera) apresentaram presença de salmonela no grupo irradiado com 1,0 kGy e no grupo irradiado com 1,5 kGy, os pontos B e D (Castelhanos) indicaram presença de salmonela.

O padrão da legislação brasileira (BRASIL, 2001a) é ausência de *Salmonella* em 25 g de amostra. Sendo assim, não há evidência de diferença significativa entre as proporções observadas nas amostras a 1,0kGy e a 1,5kGy com o padrão (teste binomial; $p > 0,05$). O grupo Controle, no entanto, apresentou, com significância estatística ($p < 0,05$), proporção superior ao padrão da legislação: teste binomial; valor-p = 0,031.

O limite infeccioso de *Salmonella* indicado pela FAO (1997) é a partir de 10^2 UFC na amostra analisada. Este valor está acima da legislação brasileira que recomenda ausência da bactéria, e por isso a metodologia de análise é de isolamento e não contagem. A contagem não foi determinada no presente trabalho.

Riedel (2005) afirmou que apesar da *Salmonella* (*S. typhi* e *S. paratyphi*) ser de origem humana e animal, é encontrado, frequentemente, em águas poluídas e concentradas em ostras, mexilhões e mariscos que pode ser observado no presente trabalho.

Jay (2005) afirmou que análise de mariscos da costa da Florida apresentaram em 43% das amostras a presença de *Salmonella* spp. Mohamed Hatha e Lakshmanaperumalsamy (1997) analisaram 730 amostras de peixe e 276 de crustáceos em mercado de peixe no sul da Índia e encontraram *Salmonella* spp. em 14,25% das amostras de peixe e 17,39% nas amostras de crustáceo. Gil (2010) analisou amostras de sururu e vongole quanto a presença de *Salmonella* spp., e encontrou incidência da bactéria em 10% em sururu e de 20% em vongole. Vieira (2004) indicou que nos Estados Unidos da América em análise de amostra de pescado consumido cru, a taxa de prevalência foi de 1% para ostras, 3,4% para moluscos e 12,2% em peixe cru. Farias (2008) analisou amostras de ostras (*Crassostrea* spp.) do litoral do Paraná e não foi identificada a presença de

Salmonella spp.; assim como Damasceno (2009) pesquisando *Salmonella* spp. em salmão eviscerado e resfriado de estabelecimentos varejistas de Belo Horizonte. Esses resultados estão bem inferiores ao do presente estudo que ocorreu a presença em 100% das amostras não irradiadas.

Jay (2005) indicou como valores D_{10} de radiação para *Salmonella* spp. 0,13 kGy e 0,800 kGy, semelhante a Molins (2001) que afirmou que a dose D_{10} para *Salmonella* spp. varia de acordo com o tipo de alimento e temperatura de conservação de 0,416 a 0,57 kGy. Enquanto, Massaguer (2005) indicou uma dose mais alta de 4,75 kGy para reduzir sete ciclos logaritmos de *Salmonella* spp. em carnes de frango. Molins (2001) indicou como a dose de extinção de *Salmonella* spp. em pescado congelado é de 4,0 a 5,0 kGy e para *Salmonella enteritidis* em ostras vivas é de 2,5 kGy. Corroborando com os dados, como a determinação é qualitativa (presença) da *Salmonella* a dose utilizada no presente trabalho de 1,0 kGy e 1,5 kGy em mexilhão *in natura* não foi suficiente para a extinção da bactéria.

Das 21 colônias de *Salmonella* encontradas, oito foram provenientes do enriquecimento por caldo Tetracionato (CT) e 13 por caldo Rappaport Vassiliadis (CRV) (Figura 9). Quanto ao isolamento foram oito provenientes do meio Hectoen (HE), sete do meio Salmonella Diferencial (SD) e seis do meio Bile Peptona Lactose Sacarose (BPLS). Não há diferença entre as proporções de SD, BPLS e HE (qui quadrado = 0,286; gl. = 2; valor-p = 0,867) (Figura 10). Estes resultados estão expressos através de gráficos em setores, assim como a relação entre os meios de enriquecimento e isolamento (Figura 11).

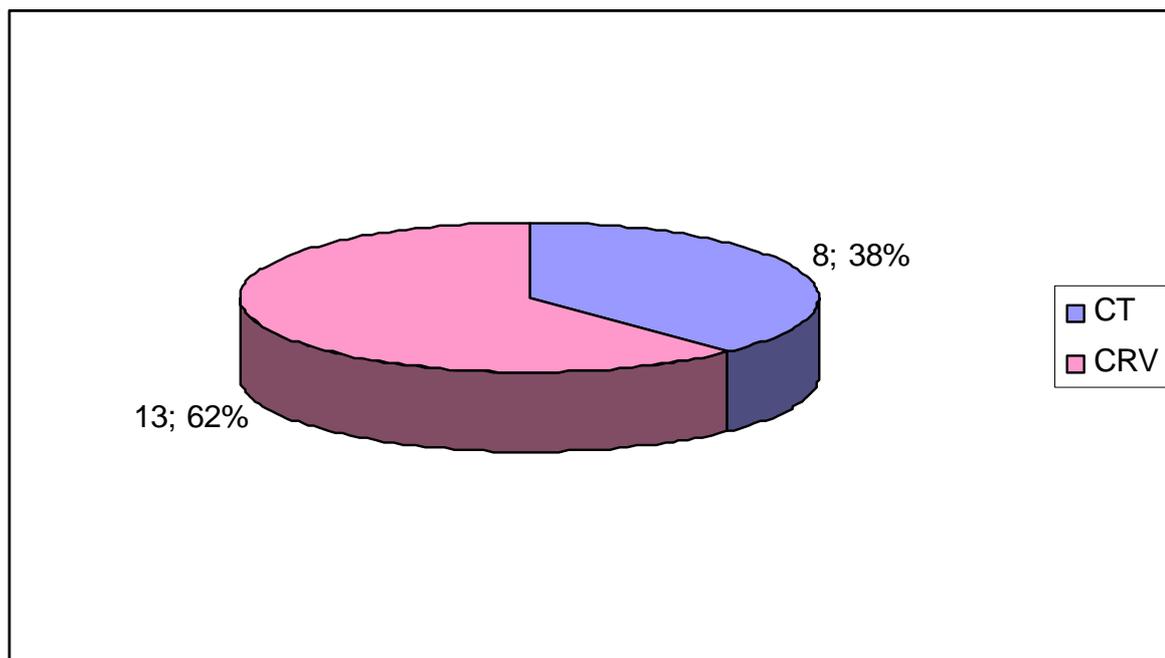


Figura 9: Resultados positivos para a presença de *Salmonella* spp. em relação aos meios de enriquecimento utilizados, valores e proporções.

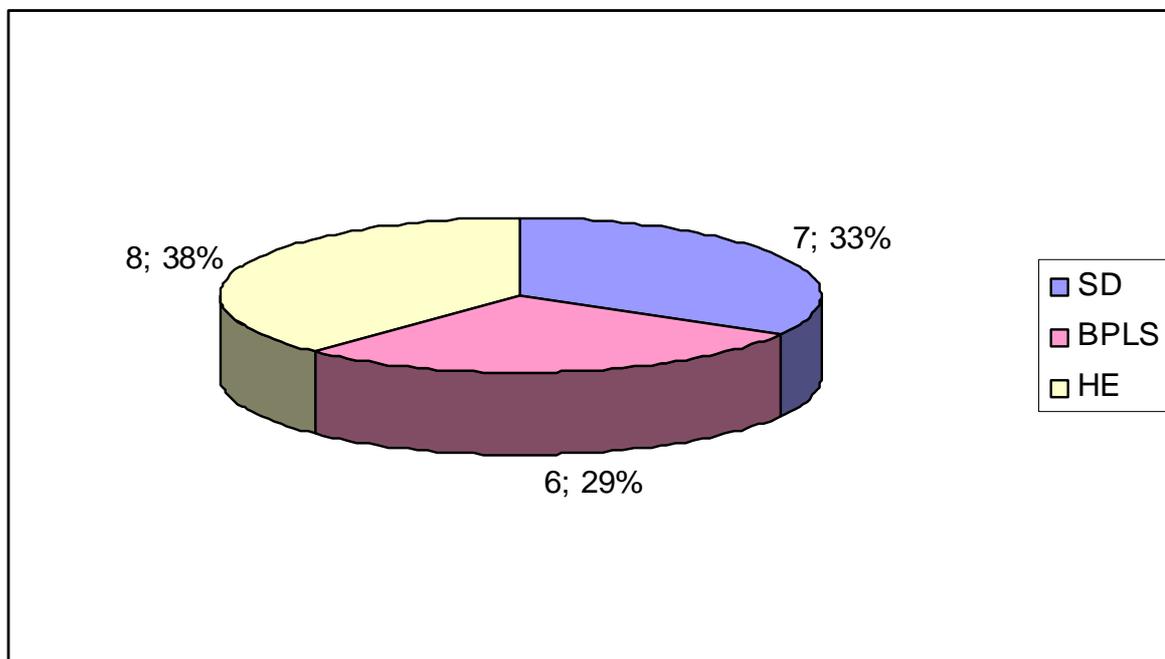


Figura 10: Resultados positivos para a presença de *Salmonella* spp. em relação aos meios de isolamento utilizados, valores e proporções.

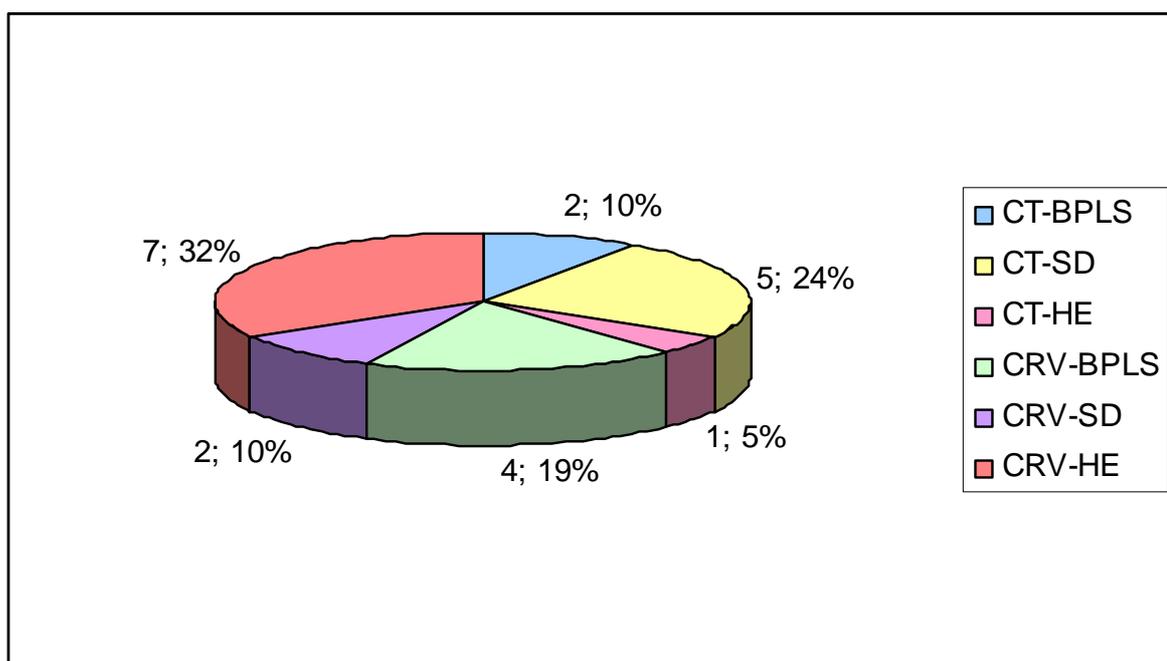


Figura 11: Frequencia de isolamento de *Salmonella* spp. na relação entre os meios de enriquecimento e isolamento, valores e proporções.

4.3 COLIFORMES TOTAIS E FECAIS

4.3.1 Coliformes totais

Os resultados de coliformes totais variaram no grupo controle de 90 a 930 NMP/g, sendo que no ponto de coleta B (Tapera) não foi encontrado resultado positivo. No ponto de coleta E (Maciés) foi detectada a maior contagem. Todavia, no grupo irradiado com 1,0 kGy, os valores estavam entre 90 e 230 NMP/g, porém os pontos D (Castelhanos) e E (Maciés) não foram enumerados estes microrganismos. Enquanto que o grupo com 1,5 kGy Resultados positivos para a presença de *Salmonella* spp. ocorreu enumeração (230 NMP/g) apenas nos pontos C (Passa Terra) e D (Castelhanos), os demais pontos não tiveram crescimento.

As médias dos grupos foram: 336 NMP/g para Controle; 110 NMP/g para 1,0 kGy e 92 NMP/g para 1,5 kGy. Na Figura 12 observa-se a distribuição dos dados segundo os grupos, por meio de um diagrama de caixa (“box plot”).

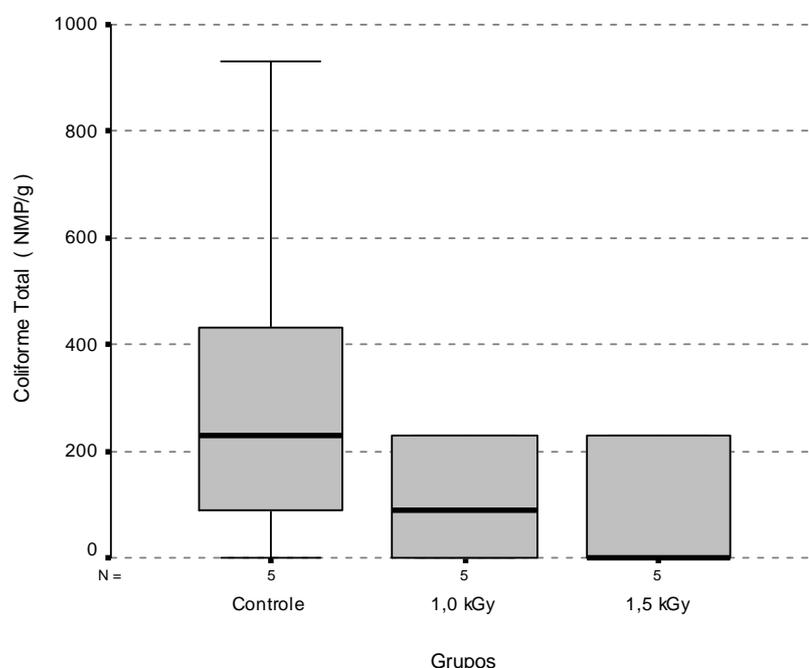


Figura 12: Distribuição da contagem de coliformes totais por grupos de análises.

Em relação aos pontos de coleta, o ponto C foi o que apresentou maior contagem em todos os grupos e os pontos A (Araçatiba) e B apresentaram menores contagens.

Comparando as médias por grupo pela análise de variância (ANOVA) houve inexistência de diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os níveis de radiação considerados. O resumo dos achados pela ANOVA está expresso na Tabela 2.

Tabela 2: Descrição da análise de variância (ANOVA) entre os grupos para os resultados de NMP de coliformes totais.

Fonte de variação	Soma de quadrados	de Graus de liberdade	Quadrado médio	F_0	valor-p
Níveis de radiação	184893.3	2	92446.7	2.169	0.177
Pontos de coleta	322226.7	4	80556.7		

Resíduos	340973.3	8	42621.7
Total	848093.3	14	

Não há padrão exigido pela legislação brasileira quanto ao NMP de coliformes totais, porém a presença dessa microbiota é indicativa de contaminação ambiental. Segundo o Codex Alimentarius (FAO, 2009), toda a água de cultivo e/ou carne dos moluscos bivalves deve ser monitorada para detectar a presença de *E. coli* / coliformes fecais ou coliformes totais, pois são importantes bactérias indicadoras de grau de contaminação fecal. O índice encontrado nos mexilhões analisados no presente trabalho pode ser considerado baixo.

4.3.2 Coliformes fecais

Os resultados obtidos pelo NMP de coliformes fecais para o grupo controle variaram de 40 a 230 NMP/g de mexilhão, sendo que nos pontos B (Tapera) e E (Maciés) não houve crescimento bacteriano; que resultou em média de 72 NMP/g para o grupo. Todavia, o grupo irradiado com 1,0 kGy não apresentou nenhum crescimento nos cinco pontos de coleta, logo sua média foi igual a 0 NMP/g. Um valor um pouco acima (média: 8 NMP/g) da média anterior foi encontrado no grupo 1,5 kGy, pois no ponto de coleta D (Castelhanos) houve crescimento (40 NMP/g).

A Figura 13 ilustra a distribuição dos dados segundo os grupos, por meio de um diagrama de caixa (“box plot”).

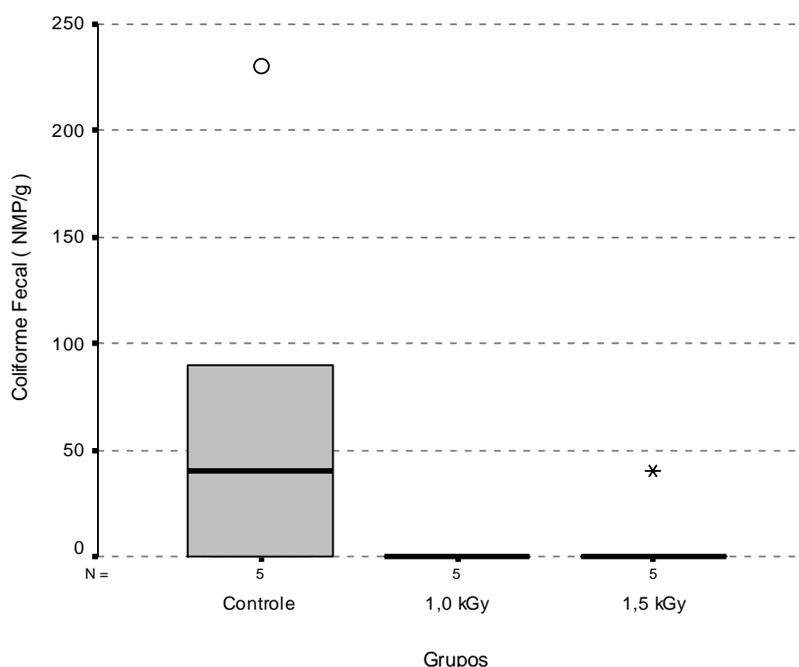


Figura 13: Distribuição da contagem de coliformes fecais por grupos de análises.

Na legislação brasileira de padrão microbiológico (BRASIL, 2001a) não consta limites para coliformes fecais em moluscos bivalves *in natura*, porém muitas pessoas consomem o produto cru ou mal cozido. Sendo assim, assume-se o padrão adotado para moluscos bivalves de 50 NMP/g. Estando a média do grupo controle fora do padrão da legislação.

A FAO (1997) determina como dose infecciosa mínima para *E. coli*, 10^1 a 10^3 . Segundo o Codex Alimentarius (2010), moluscos bivalves vivos ou crus têm como padrão microbiológico internacional para *E. coli* de menos de 230 NMP/g. Considerando o valor padrão internacional, no presente trabalho foram encontradas as médias dos grupos dentro do padrão, porém o grupo controle, na análise do ponto C (Passa Terra) apresentou resultado (230 NMP/g) no limite do padrão internacional. Enquanto no ICMSF (2010) consta um padrão mais rigoroso de no máximo 16 NMP/g de *E. coli*, para este padrão os grupos irradiados estariam dentro do limite permitido enquanto o grupo controle estaria fora do padrão.

Segundo Forsythe (2002), a dose infectante estimada para *E. coli* é de 10^6 a 10^7 UFC/g, dose bem superior a encontrada.

Gil (2010) analisou amostras de sururu e vongole e determinou a quantidade de coliformes totais e fecais presentes nas amostras. Para sururu, os resultados

foram máximo de $3,0 \times 10^7$ NMP/g para coliforme total e mínimo de $7,0 \times 10^4$ NMP/g e 80% das amostras estavam fora do padrão da legislação para coliforme fecal e apresentou altos índices de contaminação fecal. Para vongole, os resultados ainda foram maiores, máximo de $5,0 \times 10^8$ para coliforme total e $>6,5 \times 10^6$ para coliforme fecal. Estes valores são superiores aos encontrados no presente trabalho tanto para coliforme total quanto para fecal.

Farias (2008) pesquisou a presença de coliformes totais e fecais em amostras de ostras (*Crassostrea* spp.) coletadas em diferentes pontos do litoral do Paraná com destaque para a Baía de Guaratuba. Em todos os pontos foi detectada a presença de coliformes totais em percentual por amostra variando de 100% a 25% entre os pontos, enquanto que só em metade dos pontos foi identificada *E. coli* com percentual por amostra variando entre 67% e 33%. O presente trabalho não identificou coliformes totais ou fecais em todas as amostras

Forcelini (2009) analisou amostras de ostras quanto à quantidade de *E. coli* em diferentes pontos e obtiveram valores máximos entre 1176, 276 NMP/g no ponto interno e 413,576 NMP/g no ponto externo da Baía de Guaratuba, PR. Estes valores estão muito superiores ao encontrado no presente trabalho. Enquanto, Morelli (2003) amostras de ostras, proveniente de duas barracas da Praia do Futuro em Fortaleza, foram analisadas quanto à quantificação de coliformes fecais, foram encontrados valores entre <3 e > 110.000 NMP/g, o resultado encontrado nessa pesquisa se aproxima mais dos valores mínimos encontrados.

Em relação à média apresentada, apenas o grupo controle não difere do padrão assumido ($t = 0,514$; g.l. = 4; valor-p = 0,635), sendo considerado fora do limite aceitável. Os demais grupos estão significativamente abaixo do padrão assumido, sendo próprio para consumo (grupo 1,0 kGy: t não pode ser calculada por não haver variação nos valores observados; e grupo 1,5 kGy: $t = -5,250$; g.l. = 4; valor-p = 0,006).

Apesar de não poder ser calculada no grupo 1,0 kGy, o comportamento da estatística t no entorno do valor 0 com variabilidade tendendo a zero, indica uma diferença altamente significativa em relação ao valor padrão assumido. Assim, o tratamento a 1,0 kGy reduz significativamente os coliformes fecais.

Os pontos B (Tapera) e E (Maciés) não apresentaram crescimento de coliformes fecais nas amostras representativas analisadas. Ao passo que, o ponto C

apresentou maior resultado (mesma tendência observada nos resultados apresentados pela análise de coliformes totais). O resultado de NMP dos pontos A (Araçatiba) e C foram superiores ao padrão recomendado pela legislação. O ponto B apresentou a mesma dinâmica de obter menor resultado em coliformes totais.

Ao comparar as médias dos grupos com restrição por ponto de coleta pela análise de variância (ANOVA) indicou inexistência de diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos. A Tabela 3 apresenta o resumo dos achados pela ANOVA.

Tabela 3: Descrição da análise de variância (ANOVA) entre os grupos para os resultados de NMP de coliformes totais.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F ₀	valor-p
Níveis de radiação	15573.3	2	7786.7	2.381	0.154
Pontos de coleta	11800	4	2950		
Resíduos	26160	8	3270		
Total	53533.3	14			

Segundo Jay (2005) a dose D₁₀ para eliminação de *E. coli* e *E. coli* O157:H7 é de 0,20 kGy e 0,307 kGy, respectivamente. As doses administradas neste trabalho (1,0 e 1,5 kGy) foram capazes de reduzir significativamente o NMP/g de *E. coli*.

Molins (2001) indicou uma dose de 1,5 kGy para extinção de *E. coli* em ostras (*Crassostrea virginica*) e de menor que 2,0 kGy para camarões, em sépia seca este valor aumenta para 3,0 kGy. No presente trabalho a dose de 1,0 kGy fez o mesmo efeito em mexilhões *in natura*.

Semelhante aos resultados obtidos, Marins (2003) analisando o efeito da radiação ionizante em carne de rã observou redução na média dos resultados de *E. coli* convertida em logaritmos com o aumento da dose de irradiação, as médias foram 1,28 log NMP/g para o grupo controle (0 kGy); 1,11 log NMP/g para o grupo irradiado com 2 kGy; 0,92 log NMP/g para irradiado com 5 kGy e 0,36 log NMP/g para 7 kGy. Valente (2004) irradiando amostras de mexilhão com 3, 5 e 7 kGy encontrou diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os

irradiados no resultado de NMP de *E. coli*, as médias de NMP/g de mexilhão foram 0,35 log NMP/g para o grupo controle; 0,06 log NMP/g para 3 kGy; 0,04 log NMP/g para 5 kGy e 0 log NMP/g para 7 kGy.

Diferentemente, Siqueira (2001) irradiando tilápia constatou que a dose de 2,2 kGy não foi efetiva para reduzir a carga bacteriana para coliformes fecais.

4.4 *Vibrio parahaemolyticus*

Não foi identificada nenhuma colônia de *Vibrio parahaemolyticus* nas amostras analisadas, tanto em relação ao grupo como ao ponto de coleta.

A Resolução RDC nº 12 da ANVISA, (BRASIL, 2001a) não contempla um padrão de limite de crescimento para este tipo de microrganismo, apesar da infecção pelo mesmo estar altamente associada ao consumo de molusco bivalves *in natura*.

A FAO (1997) determina como dose infecciosa mínima para *V. parahaemolyticus* mínima 10^6 UFC/g de pescado. O presente trabalho não identificou nenhuma cepa de *V. parahaemolyticus* estando dentro do padrão internacional.

Matté e colaboradores (1994) ao estudarem a distribuição de *Vibrio* em ostras provenientes do Estado de São Paulo encontraram predomínio de *V. parahaemolyticus* em 77% das cepas identificadas. Pereira e colaboradores (2007a) realizaram outro estudo investigativo com ostras (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas *in natura* em restaurantes da cidade do Rio de Janeiro e identificaram oito diferentes espécies de *Vibrio*, apresentando uma alta prevalência do *V. parahaemolyticus* (45%). Esta alta incidência não foi encontrada no presente estudo.

Kaysner e colaboradores (1990) detectaram contaminação por *V. parahaemolyticus* em 100% das amostras analisadas de ostra proveniente de Grays Harbor, Washington. Enquanto, Archer e Moretto (1994) pesquisaram a ocorrência de *V. parahaemolyticus* em mexilhões (*Perna perna*) de banco natural do litoral do município de Palhoça, SC, identificou um índice de contaminação por esta bactéria

de 52,5% das 40 amostras analisadas. No presente estudo apresentou ausência de *V. parahaemolyticus*.

Barros e colaboradores (2007) analisaram 60 amostras de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) de duas barracas da Praia do Futuro em Fortaleza, Ceará e isolaram 140 cepas de *Vibrio* sacarose negativa dentre as quais 57 foram identificadas até espécie sendo predominantemente *V. parahaemolyticus* (54%).

Em estudo investigativo foi verificada a presença de *V. parahaemolyticus* em amostras de moluscos bivalves (ostra e mexilhão) coletadas em restaurantes do Rio de Janeiro. Foram pesquisadas 50 amostras de moluscos bivalves e isoladas 141 cepas de *V. parahaemolyticus*, sendo 60 cepas isoladas a partir da mesma metodologia usada no presente trabalho (NMP), 86,4% das cepas foram detectadas em ostra e 13,5% a partir de mexilhão (PEREIRA et. al., 2004). Este trabalho não foi identificada a presença da espécie.

Pereira e colaboradores (2007b) identificaram 17 cepas de *V. parahaemolyticus* em 86 amostras de mexilhão (*Perna perna*) coletadas em Jurujuba, Niterói, RJ; totalizando presença da bactéria em 11,6% das amostras *in natura* e pré-cozidas analisadas. A maior parte das cepas isoladas (64,7%) foi encontrada em mexilhões *in natura*. Esta pesquisa não foi isolada cepa de *V. parahaemolyticus*.

Pesquisa realizada em 12 amostras de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, coletadas o Rio Cocó na cidade de Fortaleza detectou *V. parahaemolyticus* em apenas uma das amostras (SOUSA et. al., 2004), mostrando baixa incidência assemelhando-se ao presente trabalho.

A dose de radiação efetiva para eliminação do gênero *Vibrio* estaria na faixa entre 1,5 a 2,0 kGy (IAEA, 2001). Segundo Moraes e colaboradores (2000), a dose de 1,41 kGy é suficiente para a eliminação de *Vibrio cholerae* O1; para Jakabi (2001) basta uma dose de 1,0 kGy para a mortalidade do *V. parahaemolyticus*. Em adicional Molins (2001) afirmou que a dose de extinção para *Vibrio parahaemolyticus* em ostra (*Crassostrea virginica*) é de 1,0 kGy e para camarão do Golfo do México inoculado com a bactéria é de 0,3 kGy; e a dose D₁₀ em camarão congelado é de 0,1 kGy. Não pode ser analisada a eficiência da dose no presente trabalho, pois *V. parahaemolyticus* não foi identificado em nenhuma amostra.

4.5 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DOS PONTOS DE COLETA

Os resultados medidos pela sonda nos pontos da coleta estão descritos na Tabela 4. As médias de temperatura, pH e salinidade entre os pontos de coleta são 24,96°C, 7,01 e 37,11 ppm, respectivamente.

Tabela 4: valores dos parâmetros físico-químicos dos pontos de coleta.

Pontos de coleta	temperatura	pH	salinidade
A: Araçatiba	24,89°C	8,73	38,74 ppm
B: Tapera	25,1°C	8,77	36,55 ppm
C: Passa Terra	24,93°C	8,76	37,22 ppm
D: Castelhanos	24,8°C	8,82	35,65 ppm
E: Maciés	25,1°C	8,78	37,4 ppm

Alguns fatores são limitantes para o desenvolvimento e resistência bacteriana, a FAO (1997) indicou como condições ótimas para o crescimento de *V. parahaemolyticus*, temperatura de 37°C e mínima de 5°C, pH mínimo de 4,8. Vieira (2004) afirmou que *V. parahaemolyticus* é anaeróbio facultativo. Seu crescimento ocorre melhor em pH alcalino entre 7,5 e 8,5 e temperatura ótima de 35 a 37°C. O presente trabalho foi coletado no outono com temperaturas mais baixas que a considerada ótima para o crescimento desta bactéria. Os dados indicam que o pH dos pontos de coletam estavam superior ao valor ideal para crescimento do microrganismo, enquanto a temperatura estava abaixo do ideal para a multiplicação.

Archer e Moretto (1994) identificaram *V. parahaemolyticus* em 52,5% das amostras de banco natural de mexilhões em Palhoça, SC em condições ambientais de temperatura e salinidade da água com média de 25,4°C e 35,6 ppm, respectivamente. Média de temperatura um pouco superior ao do presente trabalho e salinidade inferior à encontrada, e onde não foi determinada a presença do microrganismo.

5 CONCLUSÃO

Através dos resultados apresentados, conclui-se que:

- Todas as amostras estavam dentro do padrão da legislação brasileira para *Staphylococcus* coagulase positiva, sendo que as amostras irradiadas apresentaram crescimento significativo menor do que a não irradiada;
- A presença de *Salmonella* spp. foi identificada em todos os grupos, porém no grupo controle todas as amostras foram positivas enquanto que nos grupos irradiados só foi identificada a bactérias em dois pontos de coleta em cada. Sendo assim, o grupo controle apresentou pior resultado comparado aos grupos irradiados em relação à legislação vigente. Porém, as doses 1,0 kGy e 1,5 kGy não foram efetivas para a extinção da *Salmonella* spp.
- Quando aos meios de culturas utilizados para o enriquecimento e isolamento da *Salmonella* spp., os resultados foram semelhantes.
- A presença de coliformes totais foi relativamente baixa, sendo o que o grupo que apresentou maior enumeração foi o controle.
- Para coliformes fecais, o grupo controle se apresentou fora da legislação, tendo sido efetivas as doses utilizadas para a redução de coliformes fecais.
- A presença de *Vibrio parahaemolyticus* não foi identificada entre as amostras.

O consumo do mexilhão da região analisada *in natura* ou mal cozido (grupo controle) pode levar a risco de Saúde Coletiva, devido à presença de *Salmonella* spp. e a enumeração de coliformes fecais fora do limite seguro.

O grupo irradiado a 1,0 kGy foi o que apresentou melhor resultado bacteriológico, entretanto as doses utilizadas não foram suficientes para tornar o alimento seguro na medida que não foi efetiva para a extinção de *Salmonella* spp. permanecendo o produto fora do padrão da legislação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. *Compendium of Methods for Microbiological Examination of the Foods*. 4. ed. Washington: APHA, 2001. 600 p.

ARAÚJO, M.R.E.; AQUINO, C.; SCARAMAL, E.; CIOLA, C.S.; SCHETTINO, G.; MACHADO, M.C.C. *Vibrio vulnificus* infection em São Paulo, Brazil: case report and literatura review. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. São Paulo: The Brazilian Journal of Infectious Diseases and Contexto Publishing, v. 11, n. 2, p. 302-305, 2007.

ARCHER, R.M.B.; MORETTO, E. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em mexilhões (*Perna perna* Linnaeus, 1758) de banco natural do litoral do Município de Palhoça, Santa Catarina, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro: FIOCRUZ, v. 10, n. 3, p. 379-386, jul.-set., 1994.

ASHIE, I.N.A; SMITH, J.P.; SIMPSON, B.K. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Nova Jersey, EUA:Taylor and Francis Group v.36, p.87-121, 1996.

AYULO, A.M.; MACHADO, R.A.; SCUSSEL, V.M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam: Elsevier Science, v.24, n.1-2, p. 171-178, 1994.

BARARDI, C.R.M.; SINCERO, T.C.M.; CORREA, A.A. Contaminação de moluscos bivalves por patógenos humanos. In: SILVA-SOUZA, A.T. (Ed.). *Sanidade de organismos aquáticos no Brasil*. Maringá: ABRAPOA, 2006. 387 p., cap. 5, p. 95-117.

BARROS, L.M.O.; SOUSA, O.V.; LIMA, E.A.; MACRAE, A.; VIEIRA, G.H.F.; VIEIRA R.H.S.F. Víbrios sacarose negativos isolados de ostras *Crassostrea rhizophorae* comercializadas em barracas de praia na cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil. *Boletim tecnico-cientifico do CEPNOR*, Belém: IBAMA, Centro de Pesquisa e Extensão Pesqueira do Norte do Brasil, v. 7, n. 1, p. 9 -16, 2007.

BEIRÃO, H.; TEIXEIRA, E.; MEINERT, E.M. Processamento e industrialização de moluscos. In: SEMINÁRIO E WORKSHOP TECNOLOGIAS PARA APROVEITAMENTO INTEGRAL DO PESCADO, 1., 2000, Campinas. *Anais...* Campinas: ITAL, 2000. p. 38-84.

BORGHETTI, N.R B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R. 2003. *Aqüicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo*. Curitiba: Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, 2003. 129 p.

BRASIL. Decreto nº 72.718, de 29 de agosto de 1973. Estabelece Normas Gerais sobre Irradiação de Alimentos. *Ministério da Saúde*. Brasília, DF, 1973.

_____. Instrução Normativa DAS nº62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*, Brasília, DF, 2003.

_____. Portaria nº9 DINAL/MS, de 8 de março de 1985. Aprova as Normas Gerais para a Irradiação de Alimentos e a Relação de Alimentos cuja Irradiação é autorizada. *Ministério da Saúde*. Brasília, DF, 1985.

_____. Portaria nº9, de 20 de março de 2003. Proíbe a extração de mexilhões nos costões naturais. *Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA*, Brasília, DF, 2003.

_____. Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Ministério da Saúde*. ANVISA, Brasília, DF, 2001a.

_____. Resolução RDC nº 21, de 20 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico para a Irradiação de Alimentos. *Ministério da Saúde*. ANVISA, Brasília, DF, 2001b.

CARDONHA, A.M.S.; CASIMIRO, A.R.S.; VIEIRA, R.H.S.F. Identificação de bactérias psicotróficas em caudas de lagosta, durante processo industrial com tripolifosfato de sódio. *Higiene Alimentar*, São Paulo: Impress, v. 8, n. 31, p. 29-34, 1994.

CARMO, G.M.I.; OLIVEIRA, A.A.; DIMECH, C.P.; SANTOS, D.A.; ALMEIDA, M.G.; BERTO, L.H.; ALVES, R.M.S.; CARMO, E.H. Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA): Vigilância epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 1999 - 2004. Boletim Eletrônico Epidemiológico, Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), São Paulo, v.5, n.6, p.1- 7, 2005. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf>. Acesso em: jun. 2010.

CDC. *Vibrio vulnificus*. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/vibriov_gi.html>. Acesso em: jun. 2008.

CNEN. *Descubra os benefícios da energia nuclear*. Agricultura – Irradiação de Alimentos. Disponível em: <http://www.cnen.gov.br/ensino/aplicacoes_sociais.asp>. Acesso em: ago. 2006.

CODEX. CAC/RCP 19-1979, Rev. 2-2003. *Recommended International Code of Practice for a radiation processing of food*. Disponível em: <www.codexalimentarius.net/download/standards/18/CXP_019e.pdf>. Acesso em: fev. 2008a.

CODEX. STAN 106-1983 Rev. 1-2003. Disponível em: <www.codexalimentarius.net/download/standards/16/CXS_106e.pdf>. Acesso em: jan. 2008b.

CODEX ALIMENTARIUS. CAC/RCP 52-2003. Código de práticas para El pescado y los productos pesqueros. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/a1553s/a1553s00.pdf>>. Acesso em: jul. 2010a.

_____. CODEX STAN 292-2008. Norma para los moluscos bivalvos vivos y los moluscos bivalvos crudos. Disponível em: <www.codexalimentarius.net/download/standards/11109/CXS_292s.pdf>. Acesso em: jun. 2010b.

COOK, D.W. Microbiology of bivalves molluscan shellfish. In: WARD, D. R.; HACKNEY, C. *Microbiology of marine food products*. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. cap. 2, p. 19-34.

COSSA, D. A review of the use of *Mytilus* spp. as quantitative indicators of cadmium and mercury contamination in coastal waters. *Oceanologica Acta*, Nova York:Elsevier, v. 12, n. 4, p. 417-432, 1989.

CVE. Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica. INFORME-NET DTA. Manual das doenças transmitidas por alimentos. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica>. Acesso em: set. 2008.

DAMASCENO, A. *Qualidade (sensorial, microbiológica, físico-química e parasitológica) de salmão (*Salmo salar*, Linnaeus, 1778) resfriado, comercializado em Belo Horizonte, MG*. Belo Horizonte, 2009. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

DELINCÉE, H. Detection of food treated with ionizing radiation. *Trends in Food Science and Technology*, Amsterdam, Holanda: Elsevier, v.37, p.73-82, 1998.

EMBRARAD. Empresa Brasileira de Radiações. São Paulo, 2008. Disponível em: <http://www.embrarad.com.br/alimentos_hipertexto.asp>. Acesso em: 23 mar. 2008.

EMOL. El Mercurio online. Secretaria Regional Ministerial de Saúde do Bío. Chile. Disponível em: <<http://www.emol.com>>. Acesso em: fev. 2008.

EPAGRI. EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE SANTA CATARINA. *Manual do cultivo do mexilhão Perna perna*. Florianópolis: EPAGRI, 1994. 140 p.

EUZÉBY, J. P. *Vibrio parahaemolyticus*. In: Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire, out. 2005. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/vv/parahaemolyticus.html>>. Acesso em: ago. 2010.

EVANGELISTA, J. *Alimentos: um estudo abrangente*. São Paulo: Editora Atheneu, 2005a. 450 p.

_____. *Tecnologia de alimentos*. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005b. 652 p.

FARIAS, H. *Qualidade higiênico-sanitário na cadeia produtiva de ostras, Crassostrea sp., cultivadas na Baía de Guaratuba, PR, Brasil*. Curitiba, 2008. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

FAO. Fisheries and Aquaculture Department. Garantia da qualidade dos produtos da pesca. Roma: FAO, n.334, 1997. 176 p. FAO Documento Técnico sobre as Pescas. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/003/t1768p/T1768P00.HTM>>. Acesso em: jun. 2008.

_____. Garantia da qualidade dos produtos da pesca. Corporate Document Repository. Fisheries and Aquaculture Department. Disponível em: <<http://www.fao.org/DOCREP/003/T1768P/T1768P03.htm#ch3>>. Acesso em: jun. 2008.

_____. Codex Alimentarius. Code of practice for fish and fishery products. 5. ed. Roma: FAO, 2009. 144 p. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/a1553e/a1553e00.pdf>>. Acesso em: dez. 2009.

FDA. FDA Talk Paper. Los ostiones crudos contaminados con *Vibrio vulnificus* pueden ocasionar enfermedades e incluso la muerte. Distribuição imediata em 30 de julio de 2003. Disponível em: <<http://www.foodsafety.gov/~lrd/tpoyvibs.html>>. Acesso em: ago. 2008.

FDA/BAM. Bacteriological Analytical Manual Online. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html>>. Acesso em: jun. 2008.

FELLOWS, P.J. *Tecnologia do processamento de alimentos: princípio e prática*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602 p.

FERNANDES, F.C.; SOUZA, R.C.C.L.; JUNQUEIRA, A.O.R.; RAPAGNÃ, L.C.; RAMOS, A.B. Distribuição mundial e o impacto de sua introdução no Brasil. In: REGALLA JR., C.; WEBER, L.I.; CONCEIÇÃO, M.B. (Ed.). *O mexilhão Perna perna: biologia, ecologia e aplicações*. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 324 p., cap. 2, p. 25-30.

FERNÁNDEZ, R.; FERNÁNDEZ, N.; MARÍA, L.; MOTA, G.L. Ausência de *Vibrio parahaemolyticus* em pescado cru. *Revista Latino Americana de Microbiologia*, México: Asociacion Mexicana de Microbiologia, v.2, .n.30, p.91, abr- jun.1988.

FORCELINI, H.C.D. *Depuração de ostras de cultivo da Baía de Guaratuba, PR, Brasil*. Pontal do Paraná, 2009. 81f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Costeiros e Oceânicos) - Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná, Pontal do Paraná, 2009.

FORSYTHE, S.J. *Microbiologia da segurança alimentar*. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

FRANCO, R. M. *Escherichia coli*: ocorrência em suínos abatidos na grande Rio e sua viabilidade experimental em lingüiça frescal tipo toscana. Niterói, 2002.153 f. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) — Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2002.

_____; LEITE, A.M.O. Enumeração e identificação de *Enterococcus spp.* e cepas de *Escherichia coli* patogênicas em coxas de frango e estudo da atividade antimicrobiana das cepas isoladas. In: Seminário de Iniciação Científica e Prêmio UFF Vasconcellos Torres de Ciência e Tecnologia, 15., 2005, Niterói.

GARRITY, G.M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2. ed. Hardcover: Springer, 2005. 2816 pages; Vol. 2 (Parts A, B e C).

GAVA, A.J. *Princípios de tecnologia de alimentos*. São Paulo: Nobel. 1984. 284 p.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. *Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos*. 2. ed. rev. ampl. São Paulo: Varela, 2003. 655 p.

GIL, A.G. Pesquisa de coliformes e Salmonella spp. em mariscos processados, congelados e refrigerados. Disponível em: <<https://download.ufba.br/download/sisbic/relatorio/1099.pdf>>. Acesso em: ago. 2010.

GONZÁLEZ-EXCALONA, N.; CACHICAS, V.; ACEVEDO, C.; RIOSECO, M.L.; VERGARO, J.A.; CABELLO, F.; ROMERO, J.; ESPEJO R.T. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerging infectious diseases*, Atlanta: National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention. v.11, n.1, p. 129-131, 2005.

GUIMARÃES, A.G.; LEITE, C.C.; TEXEIRA, L.D.S.; SANTANNA, M.E.B.; ASSIS, P.N. Detecção de *Salmonella* spp. em pacientes e manipuladores envolvidos em um surto de infecção alimentar. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, Salvador: Universidade Federal da Bahia, v.2, n.12, p.1-4, jan. 2001.

HENRIQUES, M.B. *Resistência do mexilhão Perna perna (Linnaeus, 1758) proveniente de bancos naturais da baixada santista, a variações de temperatura, salinidade, tempo de exposição ao ar e determinação da incidência de parasitismo*. Rio Claro, 2004. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2004.

_____, PEREIRA, O.M., ZAMARIOLI, L.A.; FAUSTINO, J.S. Contaminação bacteriológica no tecido mole do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) coletado nos bancos naturais do litoral da Baixada Santista. *Arquivos de Ciências do Mar*, Ceará: UFCE, LABOMAR, v. 33, p.69-76, 2000.

HOFFMANN, F.L.; GARCIA-CRUZ, C.H.; VINTURIM, T.M.; FÁZIO, M.L.S. Levantamento da qualidade higiênico-sanitária do pescado comercializado na cidade de São José do Rio Preto, SP. *Higiene Alimentar*, São Paulo: Impress, v.14, n. 64, p. 45-47, set. 1999.

HONDA, T.; YOH, M.; KONGM UANG, U.; MIWATANI, T. Enzyme Linked Immunosorbent assays for detection of Thermostable Direct Hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington: American Society for Microbiology, v .45, n.3, p.38, 2000.

IAEA. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Irradiation to control *Vibrio* infection from consumption of raw seafood and fresh produce. *IAEA-TECDOC-1213*. Austria: Pan American Health Organization e Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, 2001. 77p.

_____. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Gamma irradiators for radiation processing. Vienna, Austria: International Atomic Energy Agency. Disponível em: <<http://www-naweb.iaea.org/napc/iachem/Brochgammairradd.pdf>>. Acesso em: fev. 2008. IBAMA. Estatística da Pesca e Aquicultura do Brasil. *Panorama da Aquicultura*, Rio de Janeiro: Panorama da Aquicultura, v. 15, n. 92, p. 35- 38, nov.-dez. 2004.

ICGFI. International Consultative Group on Food Irradiation. *Regulations for the Control of Food Irradiation*. Viena, 1991.

ICMS. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganismos in food. Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications. 2. Ed. Blackwell Scientific Publications. Disponível em: <<http://www.icmsf.iit.edu/pdf/icmsf2.pdf>>. Acesso em: ago. 2010.

INFOALIMENTOS. INFOALIMENTOS de 12 Abril 2004 . Disponível em: <<http://www.panalimentos.org/panalimentos>>. Acesso em: jan. 2010.

INSTITUTO CEPA. Secretaria de Estado da Agricultura e Política Rural Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina. Custo de produção do mexilhão cultivado. Dezembro de 2004. Disponível em: <http://cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/custo_mexilhao.pdf>. Acesso em: abr. 2010.

JAKABI, M. *Radiossensibilidade de Salmonella spp e vibrio parahaemolyticus incorporadas artificialmente por ostras (Crassostrea brasiliana)*. São Paulo, 2001. 76 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001.

JAY, J.M. *Microbiologia de alimentos*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

JOSÉ, V.F. *Bivalves e a segurança do consumidor*. São Paulo, 1996. 157 f. Tese (Mestrado em Ciência Ambiental) - Universidade de São Paulo. São Paulo, 1996.

KAYSNER, C.A.; ABEYTA, C.; STOTT, R.F.; KRANE, M.H.; WEKELL, M.M. Enumeration of *Vibrio* species, including *Vibrio cholera*, from samples of an oyster growing area, Gray Harbor, Washington. *Journal of Food Protection*, EUA: Ingenta, v. 53, p. 300-3001, 1990.

LAGE, H. *Coleta e comercialização do mexilhão Perna perna na Baía de Guanabara. Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro, 2006. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Oceanografia) Instituto de Geociências, Departamento de Oceanografia e Hidrologia. Universidade Estadual do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2006.

LANDGRAF, M. Avanços na tecnologia de irradiação de pescados. Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Depto. Alimentos e Nutrição Experimental. Disponível em: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/llsimcope/palestra_mariza_landgraf.pdf>. Acesso em: fev. 2008.

LEWIS, G.; LOUTIT, M.W.; AUSTIN, F.J.. Enteroviruses in mussels and marine sediments and depuration of naturally accumulated viruses by green lipped mussels (*Perna canaliculus*). *New Zealand Journal of Marine e Freshwater Research*, New Zealand: Royal Society of New Zealand, v.20, n.3, p.431-437, 1986.

LOPES, A.L.M.; CARVALHO, G.A.; MELO, G.V.; FERNANDEZ, M.A. Influência dos parâmetros ambientais no crescimento do mexilhão *Perna perna* em cultivo na enseada do Sítio Forte, Ilha Grande, RJ. XII Semana Nacional de Oceanografia. Disponível em: <http://www.esectamoios.com.br/cia_big/documentos/RES%20016.pdf>. Acesso em: maio 2010.

LÓPEZ-SABATER, E.I.; JERES, J.R.; SAGUÉS, A.X.; VENTURA, M. Bacteriological quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning: effect of tuna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. *Journal of Food Protection*, EUA: Ingenta, v.57, p.318- 323, 1994.

MACHADO, I.C; PAULA, A.M.R.; BUZZO, A.; JAKABI, M.; RISTORI, C.; SAKUMA, H. Estudo da ocorrência de contaminação orgânica no estuário da Cananéia, como subsídio para a extração, manejo e cultivo da ostra do mangue (*Crassostrea brasiliana*): análise de ostra (tecidos moles e líquido intravalvar). *Higiene Alimentar*, São Paulo: Impress, v.15, n.83, p.44-48, 2001.

MAGALHÃES, A.R.A.; FERREIRA, J.F.; FERREIRA, F.M. *Composição química*. In: REGALLA JR., C.; WEBER, L.I.; CONCEIÇÃO, M.B. (Ed.). *O mexilhão Perna perna: biologia, ecologia e aplicações*. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 324 p., cap. 6, p. 69-83.

MAGALHÃES, A.R.M. *Teor de proteínas do mexilhão Perna perna (Linné, 1758) (Mollusca, Bivalvia), em função do ciclo sexual*. São Paulo, 1985. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Departamento de Fisiologia Geral, Instituto de Biociências, USP, 1985.

MAGALHÃES, M.; MAGALHÃES, V.; ANTAS, M.G.; TATENO S. Caracterização bacteriológica e sorológica de linhagens de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de humanos e de ostras no Recife, Brasil. *Revista de Microbiologia*, São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, v.22, n.2, p. 83-88, 1991.

MANZONI, G.C.; MARTINS, M.I.E.G. Análise econômica do cultivo de mexilhões (*Perna perna*) em dois sistemas, Penha/SC. In: XLIV CONGRESSO DA SOBER "Questões Agrárias, Educação no Campo e Desenvolvimento" Fortaleza, 23 a 27 de Julho de 2006. Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural. Pôster. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/5/545.pdf>>. Acesso em: março de 2010.

MARENZI, A.W.C.; BRANCO, J.O. 2006. O cultivo do mexilhão *Perna perna* no município de Penha, SC. In: BRANCO, J. O.; MARENZI, A.W.C. (Org.). *Bases ecológicas para um desenvolvimento sustentável: estudos de caso em Penha, SC*. Itajaí: Editora da UNIVALI, 2006. 291 p. cap. 16, p. 227-244.

MARINS, L.A. *Utilização da radiação gama na conservação da carne de rã touro americana (Rana catesbeiana)*. Rio de Janeiro, 2003. 82f. Dissertação (Mestrado em Física Nuclear) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

MARQUES, H.L.A.. *Criação Comercial de Mexilhões*. São Paulo: Ed. Nobel, 1998. 111 p.

_____. *Otimização da captação de sementes de mexilhão Perna perna (Linnaeus, 1758) em coletores artificiais. Relatório parcial das atividades relativas ao projeto de pesquisa objeto de auxílio à pesquisa*. São Paulo: Instituto de Pesca, 2003. 15p.

MARQUES, H.L.A.; PEREIRA, R.T.L. Mexilhões: biologia e criação. *Boletim Técnico*. São Paulo: Instituto de Pesca, n.12, 1988. 32 p.

_____; FERREIRA, J.F.; GELLI, V.C.; MORAES, R.B.C.; NALESSO, R.C.; MARENZI, A.W.C. Biologia e ecologia de adultos. In: REGALLA JR., C.; WEBER, L.I.; CONCEIÇÃO, M.B. (Ed.). *O mexilhão Perna perna: biologia, ecologia e aplicações*. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 324 p., cap. 5, p. 55-68.

MASSAGUER, P.R. *Microbiologia dos processos alimentares*. São Paulo: Varela, 2005. 258 p.

MATTÉ, G.R.; MATTÉ, M.H.; RIVERA, I.G. MARTINS, M.T. Distribution of potentially pathogenic vibrios in oysters from tropical regions. *Journal of Food Protection*, EUA: Ingenta, v.57, n.10, p.870-873, 1994.

MOHAMED HATHA, A.A.; LAKHMANPERUMALSAMY, P. Prevalence of *Salmonella* in fish and crustaceans from markets in Coimbatore, South India. *Food Microbiology*, London: Academic Press, v.14, p.111- 116, 1997.

MOLINS, R.A. Irradiación de los alimentos: principios y aplicaciones. Trad. Alberto Ibarz Ribas. Zaragoza: Editorial Acribia, 2001. 490 p. Tradução de: *Food Irradiation: principles and applications*.

MORAES, I.R.; DEL MASTRO, N.L.; JAKABI, M.; GELLI, D.S. Estudo da radiosensibilidade ao ^{60}CO do *Vibrio cholerae* O1 incorporado em ostras. *Revista de Saúde Pública*. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. v. 34, n.1, p. 29-32, fev. 2000.

MORELLI, A.M.F. *Isolamento de enterococcus e coliformes fecais de ostras (Crassostrea rhizophorae) comercializadas na Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará*. Fortaleza, 2003. 105 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

MOURA, A.F.P.; MAYER, B.D.M.; LANDGRAF, M.; TENUTA, F.A. Qualidade química e microbiológica de camarão rosa comercializado em São Paulo. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo: USP, v.3, n.39, p.23-28, abr.-jun. 2003.

NASCIMENTO, S.M.M.; VIEIRA, R.H.S.F. *Vibrio vulnificus*. In: VIEIRA, R.H.S.F. (Ed.). *Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática*. São Paulo: Varela, 2004. 380 p., cap. 14, p. 175-185.

NEIVA, C. R. P. *Valor agregado x qualidade do pescado*. Laboratório de Tecnologia do Pescado. Disponível em: <<ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/cristiane.pdf>>. Acesso em: jul. 2009.

NI, C.Z.; HUANG, Z.G.. Faecal coliform contamination of intertidal bivalves from Hong Kong. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON THE MALACOFUNA OF HONG KONG AND SOUTHERN CHINA, 2., 1985.. Hong Kong. *Anais...*; Hong Kong: Hong Kong University Press, p.473-478, 1985.

NORBERG, A. N.; MALISKA, C.; NORBERG, C.M.B.M.; SOUZA, R.C.S.; FARIAS, R.H.G.; GOMES, N. Irradiação de *Staphylococcus aureus* com gama do cobalto – ^{60}Co . *Revista Ciência, Biologia e Saúde*, v. 1, n.1, p. 58 – 66, set/dez 2000.

ORDÓÑEZ, J.A.; RODRÍGUEZ, M.I.C.; ÁLVAREZ, L.F.; SANZ, M.L.G., MINGUILLÓN, G.D.G.F. PERALES, L.H.; CORTECERO, M.D.S. *Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal*. Porto Alegre: Artmed, 2005. 279 p. v.2.

OGAWA, M.; MAIA, E.L. *Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado*. São Paulo: Livraria Varela, 1999. 428 p. v.1

PEREIRA, C.S.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, D.P. *Vibrio parahaemolyticus* produtores de uréase isolados a partir de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) coletadas *in natura* em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.24, n.4, p.591-595, out.-dez. 2004.

_____; VIANA, C.M.; RODRIGUES, D.P. *Vibrios* patogênicos em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) servidas em restaurantes no Rio de Janeiro: um alerta para a Saúde Pública. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Brasília: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.40, n.3, p. 300-303, maio-jun., 2007a.

PEREIRA, C.S.; POSSAS, C.A.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, D.P. Características de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de mexilhão (*Perna perna*) comercializados em Niterói, Rio de Janeiro. *Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.40, n.1, p.56-59, jan.-fev. 2007b.

PEREIRA, M.A.; M.M. NUNES; L. NUERNBERG; D. SCHULZ & C.R.V. BATISTA. Microbiology quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis – Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, v. 37, p. 159-163, 2006.

PEREIRA, O.M.; GRAÇA LOPES, R. Fixação de sementes de *Mytella falcata* (sururu) em coletores artificiais no Canal de Bertioga, Estuário de Santos, Estado de São Paulo, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo: Instituto de Pesca, v.22, n.1, p.165-173, 1995.

PILLAI, C.T. Microbial flora of mussels in the natural beds and farms. *Coastal Aquaculture: Mussel Farming, Progress and Prospects*. India: Central Marine Fisheries Research Inst., v.29, p. 41-43, 1980.

REICHENBACH-KLINKE, H.H.; AHNE, W.; NEGELE, R.D. *Enfermedades de los peces*. Zaragoza: Acribia, 1982. 507 p.

RESGALLA JR., C.R.; WEBER, L.I.; CONCEIÇÃO, M.B. *O mexilhão Perna perna (L.): biologia, ecologia e aplicações*. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 324p.

RIBEIRO-COSTA, C.S.; MARINONI, L. Mollusca. In: RIBEIRO-COSTA, C.S.; ROCHA, R.M. *Invertebrados: manual de aulas práticas*. Ribeirão Preto: Holos, p. 74-1005, 2002. 226 p. Série Manuais Práticos em Biologia

RIEDEL, G. *Controle sanitário de alimentos*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1992. 320 p.

ROCKZANSKI, M.; COSTA, S. W.; BOLL, M. G.; OLIVEIRA NETO, F. M., 2000. A evolução da aqüicultura no Estado de Santa Catarina, Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 11., 2000, Florianópolis. *Anais...* Florianópolis, ABRAQ, 2000. CD-ROM.

RODRIGUES, P.F. Caracterização sanitária de áreas de criação de moluscos bivalvos do litoral norte do Estado de São Paulo. São Paulo, 1998. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

RODRIGUES-ARIZA, A.; ABRIL, N.; NAVAS, J.I.; DORADO, G.; LOPEZ-BAREA, J.; PUEYO, C. Metal, mutagenicity, and biochemical studies on bivalves molluscs from Spanish coasts. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, New York: Wiley-Liss, v. 19, p. 112-124, 1992.

ROMERO, S.M.B.; MOREIRA, G.S. Efeitos combinados de salinidade e temperatura na sobrevivência de embriões e veligers de *Perna perna* (Linné, 1758) (Mollusca-Bivalvia). *Boletim de Fisiologia Animal*, São Paulo: USP, v.5, p.45-58, 1981.

RUBIÃO, C.A. *Vibrios patogênicos veiculados por alimentos*. Rio de Janeiro, 2008. 58f. Monografia (Especialização em Bacteriologia) – Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

RUPP, G.S.; BEM, M.M. Cultivo de Vieiras. In: POLI, C.R.; POLI, A.T.B.; ANDREATTA, E.; BELTRAME, E. *Aqüicultura: experiências brasileiras*. Florianópolis: Multitarefa Editora Ltda., 2004. 456 p. cap. 12, p. 289-308.

RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. *Zoologia dos invertebrados*. 6. ed. São Paulo: Roca, 1996. 1029 p.

SALOMÃO, L.C., MAGALHÃES, A.R.M.; LUNETTA, J.E. Influência da salinidade na sobrevivência de *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). *Boletim de Fisiologia Animal*, São Paulo: USP, v.4, p.143-152, 1980.

SANTOS, C.A.M.L. A qualidade do pescado e a segurança dos alimentos. II SIMCOPE (Simpósio de Controle do Pescado), 2006. Disponível em: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/qualidade_pescado.pdf>. Acesso em: nov. 2006.

_____. Doenças transmitidas por pescado no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 37., 2010, Rio de Janeiro. *Palestra...* Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2010 (comunicação oral).

SANTOS, E. *Moluscos do Brasil: vida e costumes*. Belo Horizonte: Itatiaia Ltda, 1982. 141 p. Coleção Zoologia Brasileira, v.7.

SANTOS, F.W. *Período de permanência de cordas do mexilhão Perna perna (L., 1758) em cultivo*. Florianópolis, 2009. 40 f. TCC (Graduação em Engenharia de Aquicultura) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

SATIN, M. La irradiación de los alimentos. Trad. Pedro L. Marquita Gutiérrez. Zaragoza, Espanha: Acribia, 2000. 175 p. Tradução de: *Food irradiation: a guidebook*.

SETYOBUDIANDI, I.; ALIFUDDIN, M.; KRISANTI, M.; EFFENDIE, H.; WARDIATNO, Y.; RATNASETIYATI, R. Bacteria in green mussel *Perna viridis* (L.) and its

environment. *Proceedings of the ninth Workshop of the Tropical Marine Mollusc Programme*, Inglaterra: Phuket Marine Biological Center, v.19, n.1, p. 145-150, 1999.

SHEA, K.M. Irradiation of Food. *Journal of the American Academy of Pediatrics*, EUA: American Academy of Pediatrics, v.106, n.6, p. 1505-1510, December 2000.

SIDDALL, S.E. Effects of temperature and salinity on metamorphosis in two tropical mussels. In: Annual Meeting of the National Shellfisheries Association, 70.; New Orleans. *Anais...*; New Orleans: National Shellfisheries Association, p.69-199, 1979.

SIQUEIRA, A.A.Z.C. *Efeitos da irradiação e refrigeração na qualidade e no valor nutritivo da Tilápia (Oreochromis niloticus)*. Piracicaba, 2001. 137f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2001.

SIVALINGAM, P.M.; RAJAGOPALAN, K.. Microbial flora in mucoidal discharge of cultured green mussel, *Perna viridis* (Linnaeus). *Indian Journal of Marine Sciences*, New Delhi: Council of Scientific and Industrial Research, Publications and Information, v. 10, n.1, p.98-100, 1981.

SOUSA, O.V. *Vibrio cholerae*. In: VIEIRA, R.H.S.F. (Ed.) *Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática*. São Paulo: Livraria Varela, 2004. 380 p. cap. 15, p. 187-198.

SOUSA, O.V.; R.H.S.F VIEIRA; F.G.R. MENEZES; C.M.F. REIS & E. HOFER. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in oyster, *Crassostrea rhizophorae*, collected from a natural nursery in the Cocó river estuary, Fortaleza, Ceará, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.46, n.2, p. 59-62, mar.-abr., 2004.

TAUXE, R.V. Food safety and irradiation: protecting the public from foodborne infections. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, v.7, n.3, p.516-521, 2001. Supplement.

TORRES, V.M.R; FERNÁNDEZ, E.E .Incidence de *Vibrio parahaemolyticus* en pescado, ostión camarón. *Revista Latino Americana de Microbiología*, México: Asociacion Mexicana de Microbiologia, v.35, n.9, p.267-272, jul.-set. 1993.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760 p.

USP. Universidade de São Paulo. Divulgação da tecnologia da irradiação de alimentos e outros materiais. Efeitos da irradiação nos alimentos. 2005. Disponível em: <<http://www.cena.usp.br/irradiacao/efeitos.htm>>. Acesso em: ago. 2006.

VALENTE, A. M. *Efeito da irradiação sobre mexilhões [Perna perna (Linnaeus, 1758)]: coliformes termotolerantes e Enterococcus; ação antimicrobiana e análise sensorial das amostras*. Niterói, 2004. 84f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Faculdade de Veterinária, UFF, Niterói, 2004.

VIEIRA, R.H.S.F. *Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática*. São Paulo: Varela, 2004. 380 p

VITAL, H.C.; LIMA, R.Q. *Apostila de Irradiação de Alimentos*. Grupo Nuclear – IPD (4) / CETEx. Rio de Janeiro, 2006.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Foodborne disease outbreaks*. Geneva, Switzerland: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2008. 152 p.

WOOD, P. C. *Manual de hygiene de los mariscos*. Zaragoza: Acribia. 86 p. 1979.