

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO EM HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO
TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**

ANGÉLICA MOREIRA VALENTE

EFEITO DA IRRADIAÇÃO SOBRE MEXILHÕES [*Perna perna* (Linnaeus, 1758)]: COLIFORMES TERMOTOLERANTES E *Enterococcus*; AÇÃO ANTIMICROBIANA E ANÁLISE SENSORIAL DAS AMOSTRAS

**NITERÓI/RJ
2004**

ANGÉLICA MOREIRA VALENTE

“Efeito da irradiação sobre mexilhões [*Perna perna* (Linnaeus, 1758)]: Coliformes termotolerantes e *Enterococcus*; ação antimicrobiana e análise sensorial das amostras”

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 em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de P.O.A.

Aprovada em 30 abril de 2004.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Robson Maia Franco- Orientador
Universidade Federal Fluminense

Prof^a. Dr^a. Eliana de Fátima Marques de Mesquita- Co-Orientador
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Edgar Francisco Oliveira de Jesus
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Niterói
2004

A Deus, esse ser maravilhoso.

À minha família, ao meu namorado João Marcelo Silveira e à eterna amiga Jussara Schwind Pedroso Stussi (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Ao término do presente trabalho, sinto-me na obrigação de externar o meu mais profundo agradecimento.

Ao Professor e amigo Robson Maia Franco, que com sua amizade e seu vasto conhecimento, me orientou, me incentivou e me fez caminhar com meus próprios pés, colocando-se sempre ao inteiro dispor para sanar as dúvidas existentes.

À Professora Eliana de Fátima Marques de Mesquita, que me mostrou o caminho pelo qual devo prosseguir, buscando sempre o reconhecimento nas trilhas da sabedoria com a transformação dos conhecimentos.

Ao Professor Edgar Francisco de Jesus, pelo conhecimento adquirido, dedicação e paciência, e pela oportunidade oferecida no Laboratório de Instrumentação Nuclear da COPPE/UFRJ, na Irradiação das amostras.

À Professora Eliane Teixeira Mársico, uma amiga que sempre me mostrou o melhor caminho a seguir, eu nunca me esquecerei de você.

Ao amigo Allan Kardec da Silveira, que me mostrou que não há vitórias sem lutas e o reconhecimento é adquirido com muito trabalho, garra e determinação.

À Professora Mônica Queiroz de Freitas, pela ajuda no tratamento estatístico dos resultados.

Ao corpo docente e técnico do Laboratório de Controle Microbiológico do Departamento de Tecnologia da UFF, pelo apoio e esclarecimentos necessários no momento oportuno.

Um agradecimento todo especial a todos os colegas de mestrado, novas e antigas amizades que pretendo manter.

À amiga Carolina Pombo, pela digitação e confecção deste trabalho.

Ao Prof^o Sérgio Borges Mano, coordenador do Programa de Pós-Graduação, pela dedicação e empenho nas solicitações.

À CAPES pelo auxílio financeiro correspondente a bolsa de mestrado.

Aos funcionários Drausio e José Luiz, por sua boa vontade em atender às inúmeras solicitações.

O meu muito obrigado a Associação Livre de Maricultores de Jurujuba (ALMARJ), Niterói-RJ, pelo fornecimento das amostras.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p. 10

LISTA DE TABELAS, p. 11

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS, p. 12

RESUMO, p. 14

ABSTRACT, p. 15

1 INTRODUÇÃO, p. 16

2 REVISÃO DE LITERATURA, p. 20

2.1 MEXILHÃO [*Perna perna* (Linnaeus, 1758)], p. 20

2.1.1 TAXONOMIA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA, p. 20

2.1.2 MITILICULTURA, p. 21

2.1.3 FLUXOGRAMA OPERACIONAL DO PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE MEXILHÕES, p. 22

2.1.4 BOAS PRÁTICAS DE PROCESSAMENTO INDUSTRIAL, p. 24

2.2 MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS, p. 24

2.2.1 *ESCHERICHIA COLI*, p. 24

2.2.1.1 Taxonomia e características culturais, p. 24

2.2.1.2 Síndromes gastroentéricas, p. 25

2.2.1.3 Significado da presença de *E.coli* em pescado, p. 26

2.2.1.4 Epidemiologia, p. 27

2.2.2 *ENTEROCOCCUS*, p. 29

2.2.2.1 Taxonomia e características culturais, p. 29

2.2.2.2 Significado da presença de *Enterococcus* em pescado, p. 30

2.2.2.3 Síndromes gastroentéricas, p. 30

2.3 IRRADIAÇÃO DE ALIMENTOS, p. 31

2.4 ASPECTOS HIGIÊNICO-SANITÁRIOS DE MOLUSCOS BIVALVES E A SAÚDE DO CONSUMIDOR, p. 36

2.5 LEGISLAÇÃO, p. 39

2.6 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS, p. 40

2.6.1 *ESCHERICHIA COLI*, p. 42

2.6.2 *ENTEROCOCCUS*, p. 43

2.7 ANÁLISE SENSORIAL, p. 45

3 MATERIAL E MÉTODOS, p. 47

3.1 MATERIAL, p. 47

3.1.1 AMOSTRAS, p. 47

3.2 MÉTODOS, p. 48

3.2.1 CONTROLE DE QUALIDADE DOS MEIOS DE CULTURA, p. 48

3.2.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS, p. 49

3.2.3 IRRADIAÇÃO DAS AMOSTRAS, p. 49

3.2.4 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS, p. 50

3.2.4.1 NMP de *Escherichia coli* – Método I, p. 50

3.2.4.2 Isolamento e identificação de cepas de *Escherichia coli* patogênicas (EIEC, EPEC, EHEC) – Método II, p. 53

3.2.4.3 Isolamento e identificação de *Escherichia coli* O157 H:7 e diferenciação de cepas enterohemorrágicas – Método III, p. 56

3.2.4.4 Enumeração, isolamento e identificação presuntiva de *Enterococcus*, p. 58

3.2.5 SOROLOGIA, p. 60

3.2.6 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS, p. 61

3.2.7 ANÁLISE SENSORIAL, p. 62

4 RESULTADOS, p. 64

4.1 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS, p. 64

4.1.1 NPM DE *ESCHERICHIA COLI* (KORNACKI e JOHNSON, 2001) – MÉTODO I E NPM DE *ENTEROCOCCUS* E IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA (HARTMAN ET AL.. 2001) , p. 64

4.1.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICAS (EIEC, EPEC, EHEC) – MÉTODO II., p. 66

4.1.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* O157 H:7 E DIFERENCIAÇÃO DE CEPAS ENTEROHEMORRÁGICAS – MÉTODO III., p. 66

4.2 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS, p. 67

4.3 ANÁLISE SENSORIAL, p. 69

5 DISCUSSÃO, p. 70

6 CONCLUSÕES, p. 75

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 76

8 APÊNDICES, p. 85

8.1: Quadro da análise de variância, em delineamento em bloco casualizado, dos escores de aceitação quanto ao aroma, em mexilhões de ambos os sexos, não irradiados e irradiados a 3kGy, 5kGy e 7kGy, p. 85.

8.2: Quadro da análise de variância, de experimento fatorial em delineamento inteiramente casualizado, dos escores de aceitação quanto ao sabor, textura e impressão global em mexilhões do sexo feminino e masculino, não irradiados e irradiados a 3kGy, 5kGy e 7kGy, p.85

8.3: Média e desvio padrão de escore de aceitação sensorial quanto ao aroma em mexilhões de ambos os sexos, não irradiados e irradiados a 3kGy, 5kGy e 7kGy, p. 86

8.4: Média e desvio padrão de escore de aceitação sensorial quanto ao sabor, textura e impressão global em mexilhões do sexo feminino e masculino, não irradiados e irradiados a 3kGy, 5kGy e 7kGy, p.86.

8.5: Tabela de escala hedônica, p. 87.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fig. 1: Representação das amostras adquiridas para análise, p. 49
- Fig. 2: Espécimes irradiadas fêmeas (cor alaranjada) e machos (cor creme) e testemunhas, p. 50
- Fig. 3: NMP de *Escherichia coli* (KORNACKI e JOHNSON, 2001) – **Método I**, p. 52
- Fig. 4: Isolamento e identificação de cepas de *E.coli* patogênicas (EIEC, EPEC, EHEC) (MENG et al. 2001) **Método II**, p. 55
- Fig. 5: Isolamento e identificação de *E.coli* O157:H7 e diferenciação de cepas enterohemorrágicas (EHEC) (MERCK, 1996) – **Método III**, p. 57
- Fig. 6: Enumeração, Isolamento e identificação presuntiva de *Enterococcus* (HARTMAN et al. 2001) , p. 59
- Fig. 7: Visualização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos, p. 62
- Fig. 8: Identificação das amostras para análise sensorial, p. 62
- Fig. 9: Utensílios e amostras usadas na análise sensorial, p. 63
- Fig. 10: Placas indicando prova positiva para hidrólise da esculina, p. 65

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Valores médios dos NMP de *Escherichia coli* e *Enterococcus* em mexilhões não irradiados (testemunha) e irradiados com doses de 3, 5 e 7 kGy, p. 64
- TABELA 2 - Isolamento e identificação de cepas de *E. coli* patogênicas (EIEC, EPEC, EHEC), p. 66
- TABELA 3 - Comportamento de 23 cepas de *Escherichia coli* isoladas e sorotipadas como patogênicas frente aos antimicrobianos, provenientes de amostras de mexilhão não irradiado (testemunha) e irradiado à 3kGy, 5kGy e 7kGy, p. 67
- TABELA 4 - Comportamento de 15 cepas de *Enterococcus* spp. isoladas, frente aos antimicrobianos provenientes de amostras de mexilhão não irradiado (testemunha) e irradiado à 3kGy, 5kGy e 7kGy, p. 68

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALMARJ	Associação Livre de Maricultores de Jurujuba
kGy	kiloGray
CBHAM	Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas
CBHAP	Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicrotróficas
FAO	“Food Agriculture Organization of the United Nations”
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CENA	Centro de Energia Nuclear na Agricultura
ONU	Organização das Nações Unidas
MeV	Mega elétronvolts
DINAL	Divisão Nacional de Alimentos
AIEA	Agência Internacional de Energia Atômica
UFC	Unidade Formadora de Colônias
COPPE	Coordenação dos Programas de Pós-graduação em Engenharia
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
OMS	Organização Mundial de Saúde
ETA	Enfermidade Transmitida por Alimentos
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S. A.
BHI	“Brain Heart Infusion”
CLS	Caldo Lauril Sulfato

EMB	Eosina Azul de Metileno
SIM	Sulfeto Indol Motilidade
MILI	Mobilidade Indol Lisina
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
NMP	Número Mais Provável
NCCLS	“National Committee for Clinical Laboratory Standards”

RESUMO

Os mexilhões por apresentarem pequeno prazo de vida comercial e possuírem intensa microbiota no seu trato intestinal, devem ser processados tecnologicamente para que tenham sua comercialização ampliada, não determinar Enfermidades Transmitidas por Alimentos (ETA) aos ingestores e impedir perdas econômicas. Um dos processos de conservação usado para atender a estes propósitos é a irradiação de alimentos, que vem sendo bastante estudada nos últimos 50 anos como uma opção para reduzir as perdas entre o produtor e o consumidor e também para redução das ETA. Foram analisadas amostras de mexilhão pré-cozido, congelado e embalado, divididos em quatro grupos: um grupo de amostra controle (testemunha), e três grupos de amostras irradiadas com doses de 3, 5 e 7kGy respectivamente. O presente trabalho teve como objetivo estudar a ocorrência de coliformes termotolerantes (*E.coli*), que são indicadores de contaminação fecal e de *Enterococcus* que podem resistir ao processo de irradiação; realizar a análise sensorial e testar a sensibilidade antimicrobiana frente aos fármacos usados no tratamento de infecções humanas. Os resultados indicaram para *E coli*, que a amostra 1 diferiu significativamente ($p < 0,05$) das amostras 2, 3 e 4, as quais não diferiram entre si ($p > 0,05$) e para *Enterococcus* o resultado obtido foi o mesmo. Das 137 colônias suspeitas e confirmadas em testes bioquímicos, 23 (31,5%), foram consideradas positivas para os sorogrupos EPEC e EIEC. As 15 cepas de *Enterococcus* spp. do grupo controle isoladas apresentaram resistência a quatro antibióticos. Não foi observado diferença significativa ($p > 0,05$) nos escores de aceitação quanto ao sabor, textura e impressão global em mexilhões machos e fêmeas irradiados e não irradiados. De onde se conclui que a irradiação foi eficaz sobre a microbiota estudada e não alterou as características sensoriais da carne de mexilhão, permanecendo com aroma e sabor “sui generis”.

Palavras - chave: irradiação, mexilhão, antibióticos, análise sensorial.

ABSTRACT

Mussels carries intensive microbiota in their gut and has a short shelflife period. So they must be technologically well processed in order to prevent economic loss and foodborne diseases. Food irradiation is one of the updated processing that has been studied for more then 50 years, as an option to reduce loss between producer and consumer and foodborne disease. Samples of precooked, frozen and packed mussels were classified into four groups: a control group (testimony) and three ones of irradiated samples with doses of 3, 5 and 7 kGy, respectively. The objective of the present research is to study the termotolerants coliforms occurrence (*E. coli*) which are faecal contamination sentinels and of *Enterococcus* that can resist to the irradiation process; sensorial analysis of the samples and test the antimicrobial sensibility to the medicines used in humans infections treatment. Sample 1 of *E. coli* showed up a significative difference ($p < 0,05$) compared with samples 2, 3 and 4. These ones did not differ among them ($p > 0,05$). *Enterococcus* results were quite similar. One hundred and thirty seven suspected colonies were confirmed with bioquimical tests and 23 (31,5%) were considered positive to the EPEC and EIEC serum groups. Fifteen variants of *Enterococcus* spp. from the control group isolated showed up resistance to the antibiotics. A significative difference among the scores of flavour, texture and global impression in irradiated and non-irradiated male and female mussels was not observed ($p > 0, 005$). We came to the conclusion that irradiation processing had an efficacy on the studied microbiota and did not modify the sensory assessment of the mussel meat which keeps a "sui generis" flavour and taste.

Key words: irradiation; mussel; antibiotics; sensorial analysis.

1 INTRODUÇÃO

A criação racional de mexilhões, ou mitilicultura, teve início na França há cerca de 700 anos. Sua descoberta é atribuída a Patrick Walton, irlandês que naufragou na costa da Bretanha (França), no século XII. Na tentativa de capturar aves marinhas, ele estendeu restos de redes de pesca entre estacas de madeira, fincados na praia de Anuis. Até o século XIX, esse sistema permaneceu praticamente inalterado, sendo realizado quase que exclusivamente na França, até que outros países como Inglaterra e, principalmente, a Espanha, passaram a praticar e aperfeiçoar o método. A 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 utilização nas criações (MARQUES e PEREIRA, 1988).

É importante saber se os patógenos humanos que vêm sendo introduzidos no meio aquático podem se multiplicar entre peixes e mariscos, e estimar a sua importância epidemiológica. Pesquisas já realizadas têm demonstrado que espécies de *Salmonella*, *Pasteurella*, *Leptospira*, *Vibrio* e outras podem se abrigar e se multiplicar nesses organismos aumentando as fontes de reinfecção humana. Certas espécies de coliformes fecais estão incriminados a elevada mortalidade (> 50%) verificada entre pessoas imunocomprometidas ou que sofrem de doenças hepáticas (FAO, 1994).

Os mexilhões são considerados bioindicadores, capazes de indicar a qualidade ambiental do ecossistema em que vivem. Essa propriedade se deve a capacidade desses organismos em acumular contaminação em seus tecidos em quantidades proporcionais às concentrações do poluente ambiental (LIMA, 1997).

Tal característica dos mexilhões faz com que exista uma grande preocupação das autoridades sanitárias com relação à origem e ao estado e conservação deste pescado destinado ao consumo humano. Os mexilhões existentes no mercado podem ser provenientes de captura extrativa, ou de cultivos, que deveriam ser localizadas em regiões de águas com padrão microbiológico estabelecido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente estabelecendo que, as águas salinas de classe 5 utilizadas na criação natural e/ou intensiva (aqüicultura) de espécies destinadas à alimentação humana e que são ingeridas cruas não podem ter concentrações médias de coliformes fecais superiores a 14/100mL, com não mais de 10% das amostras excedendo 43 coliformes fecais/100mL (BRASIL, 1986).

Os mexilhões por apresentarem pequeno prazo de vida comercial e possuírem intensa microbiota no seu trato intestinal, devem ser processados tecnologicamente para que tenham sua comercialização ampliada, não determinar Enfermidades Transmitidas por Alimentos (ETA) aos ingestores e impedir perdas econômicas. Um dos processos de conservação usado para atender a estes propósitos é a irradiação de alimentos.

A irradiação de alimentos é um processo físico de tratamento comparável à pasteurização térmica, ao congelamento, que tem a finalidade de esterilizar ou preservar os alimentos através da destruição de microrganismos, parasitas, insetos e outras pragas (CDTN, 1999). O referido centro relata que durante a Segunda Guerra Mundial, quando era necessário alimentar milhões de soldados, o exército norte - americano financiou uma série de pesquisas em irradiação de alimentos envolvendo diversos países e as organizações internacionais tais como, a FAO e a OMS, e concluíram que a irradiação de alimentos é segura e benéfica. A irradiação tem sido objeto de intensas pesquisas por mais de 50 anos. Similarmente, o valor nutricional de alimentos irradiados foi comparado com alimentos tratados por outros métodos, apresentando resultados favoráveis.

A proporção exata da população microbiana que será destruída pela irradiação depende de diversos fatores, entre eles, o conteúdo de água do alimento, e se encontra suspenso em água ou presentes no alimento. Os microrganismos patogênicos que tenham sobrevivido ao tratamento de irradiações podem representar um problema de saúde pública, se permanecerem viáveis (ORDAL 1970; SPECK, 1970; MAXCY, 1982).

O uso da irradiação em pescado e mariscos vem sendo muito estudado, pois é intenso o número de pessoas que tem o hábito de ingerir estes alimentos crus ou incorretamente cozidos, sendo responsáveis por altas taxas de morbidade e de mortalidade. O tempo de conservação do pescado é limitado, dificultando sua estocagem. Nos peixes e demais produtos marinhos comestíveis, têm-se identificado inúmeros patógenos, os quais se encontram principalmente em águas contaminadas e no pescado incorretamente manipulado e armazenado. Para impedir o crescimento bacteriano, impedir as alterações sensoriais, e reduzir ou destruir a microbiota, peixes e frutos do mar, devem ser processados tecnologicamente logo após a captura. Os peixes e frutos do mar, são irradiados com doses que variam de 1,0 a 7,0 kGy (para mariscos frescos ou congelados), o que duplica ou triplica o tempo de conservação (GERMANO e GERMANO, 2001).

A maioria dos microrganismos mostra variação de sensibilidade aos antimicrobianos, apresentando resistência múltipla e de alto nível (em mcg/ mL), envolvendo quase todos os fármacos disponíveis para a antibioticoterapia. Esta variabilidade é característica de algumas bactérias altamente prevalentes, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* entre as Gram positivas; Enterobactérias (*Shigella*, *Salmonella*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, etc), *Acinetobacter* e *Pseudomonas aeruginosa* entre as Gram negativas (MONTELLI e SADATSUNE, 2001).

Os alimentos ao serem processados, principalmente os irradiados, podem sofrer alterações que determinariam a sua recusa pelos consumidores, dependendo do grau de modificação em sua estrutura, aparência e sabor.

Nos peixes e demais produtos marinhos têm-se identificado inúmeros microrganismos indicadores e patogênicos, dentre os quais se destacam os

Enterococcus e os coliformes termotolerantes (*E. coli*), que são indicadores de contaminação fecal, que podem ser encontrados em águas contaminadas e no pescado incorretamente manipulado ou armazenado. Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar tais microrganismos que podem resistir ao processo de irradiação de alimentos, tornando-se problema para o consumidor fazendo-se necessária a realização da análise sensorial, para avaliação das alterações no sabor destes produtos. Ressaltando-se ainda que a maioria da microbiota presente em produtos de origem animal apresenta resistência a inúmeros antibióticos que são usados rotineiramente em tratamentos de infecções ocorridas no Homem.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MEXILHÃO [*Perna perna* (Linnaeus, 1758)]

2.1.1 TAXONOMIA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Mexilhão é o termo utilizado na língua portuguesa para determinar as diversas espécies de moluscos bivalves da família *Mytilidae*, sendo os gêneros mais comuns o *Perna*, *Mytilus* e *Mytella*.

O mexilhão *Perna perna* é um molusco bivalve com a seguinte classificação sistemática:

Filo Mollusca

Classe Bivalvia Linnaeus, 1758

Ordem Mytiloidea Férursac, 1822

Família Mytilidae Rafinesque, 1815

Gênero *Perna* Retzius, 1788

Espécie *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (KLAPPENBACH, 1965)

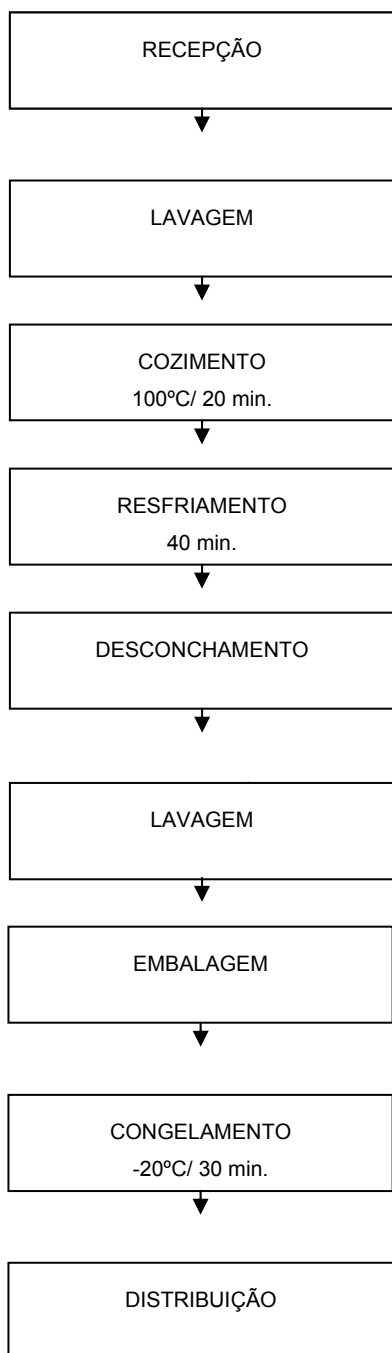
A maior área de distribuição do mexilhão *Perna perna* é ao longo da costa do continente africano até Marrocos, e na América do Sul, onde ocorre na Venezuela e ao longo da costa Atlântica, de Recife (Brasil) até o Rio da Plata (SIDALL, 1980; CHUNG e ACUÑA, 1981). Espécie nitidamente brasileira, muito abundantemente do Rio de Janeiro a Santa Catarina, Brasil (KLAPPENBACH, 1965)

2.1.2 MITILICULTURA

Mitilicultura é o nome que se dá ao cultivo de mexilhões, ou seja, de mitilídeos. Na escolha do local para o cultivo deve-se considerar uma área livre de poluição como efluentes domésticos, metais pesados e agrotóxicos (BALDINI et al., 1999); longe da desembocadura de rios, que respeite as áreas com tráfego de embarcações, pesca e banhistas; localizada em regiões abrigadas como baías e enseadas; águas com boa produtividade natural (fitoplâncton); e a profundidade mínima de 2 metros para que a estrutura do cultivo não toque o fundo (EPAGRI, 1994).

Existem diversos sistemas de cultivo de mexilhões de acordo com a bioecologia e habitat da espécie em questão. Dentre estes se pode destacar o de estacas ou “Bouchot”, utilizado na França, que serve para a coleta e engorda de sementes (mexilhão jovem, com aproximadamente 2 cm de comprimento), composto basicamente na fixação de estacas de madeira de 4 a 6 m de comprimento no fundo. O cultivo de fundo, que consiste na retirada de sementes de bancos naturais através de dragagem e transferência para parques de engorda a profundidade de 3 a 6 m, utilizado na Holanda e Alemanha. Plataformas de madeira ou bambu atadas a isopor ou outro material flutuante e ancoradas por poitas de concreto, pendurando-se as cordas em toda a área da balsa. Flutuante tipo espinhel ou “long-line”, onde um cabo-mestre disposto na superfície da água com extremidades fixadas por poitas e ao longo do cabo são fixados flutuadores e penduradas as cordas de produção; e o tipo fixo, em que estacas de bambu ou madeira são fixadas no fundo (tipo tomateiro) e transversalmente na lâmina d’água colocam-se outros bambus ou madeira, onde ficam amarradas as cordas de cultivo (BUSSANI, 1990; EPAGRI, 1994; OSTINI e GELLI, 1994).

2.1.3 FLUXOGRAMA OPERACIONAL DO PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE MEXILHÕES



FONTE: CORDEIRO, 1998.

2.1.4 BOAS PRÁTICAS DE PROCESSAMENTO INDUSTRIAL

Segundo Cordeiro (1998) várias medidas e procedimentos podem ser adotadas para evitar problemas de contaminação dos mexilhões e conseqüentes danos à Saúde Pública. Dentre os mais importantes destacamos:

- Não extrair ou cultivar mexilhões em áreas muito próximas a local de lançamento de efluentes domésticos ou industriais.
- Proceder a análise periódica da qualidade da água (microbiológica e físico-química) e da carne, nos locais de produção.
- Conservar limpa as áreas próximas ao Centro de Beneficiamento, para evitar contaminações de pessoas, materiais e equipamentos, através do ar.
- Manter a higiene pessoal dos indivíduos que beneficiam os mexilhões, principalmente antes do contato direto com o produto nas dependências do Centro de Beneficiamento.
- As instalações internas e externas do Centro de Beneficiamento devem estar sempre limpas e conservadas, antes e depois do recebimento da matéria-prima (mexilhão) para processamento.
- A pré-lavagem que ocorre na parte externa do beneficiamento deve ser suficiente para a retirada total dos materiais agregados aos mexilhões.
- Os equipamentos como mesas de desconchamento, cuba de choque térmico, caldeiras, etc, devem estar sempre limpos preferencialmente com água clorada.
- Os materiais utilizados no processamento (facas, raspadeiras, etc.) também devem ser lavadas com água clorada antes e depois da utilização.
- Os funcionários devem utilizar os equipamentos de proteção e segurança, tais como gorros, máscaras, luvas, botas, macacão e avental, sendo que estes devem estar sempre limpos.

2.2 MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS

2.2.1 *ESCHERICHIA COLI*

2.2.1.1 Taxonomia e características culturais

A *Escherichia coli* foi isolada pela primeira vez em 1985, de fezes de crianças, por Theodor Von Escherich, e em 1986 foi bem descrita, sendo considerada por Escherich e Bienstok como participante da microbiota entérica normal do homem e dos animais (CORRÊA e CORRÊA, 1992). As infecções ou toxinfecções por *E. coli* passaram a ser denominadas de colibaciloses, sendo os animais e o homem igualmente susceptíveis (SHARF, 1972).

E. coli são bastonetes Gram negativos, catalase positivos, oxidase negativos e anaeróbios facultativos, fazem parte da família *Enterobacteriaceae*, a maioria dos isolados fermenta a lactose e faz parte da flora intestinal normal (cerca de 10^6 microrganismo /g) (FORSYTHE, 2002).

Coliformes fecais e *Escherichia coli* correspondem a bactérias que fermentam lactose com produção de gás quando incubados à temperatura de 44-45,5°C. Nessas condições, ao redor de 90% das culturas de *E.coli* são positivas (ICMSF, 1978).

Kornacki e Johnson (2001) descreveram que o termo “coliformes termotolerantes” em algumas vezes é usado para referir-se a estes organismos e seja talvez mais adequado que “coliformes fecais”.

A *Escherichia coli* é a espécie comensal predominantemente na microbiota anaeróbica facultativa do trato intestinal dos humanos e dos animais de sangue quente (DRASAR e HILL, 1974). É também de um modo geral um comensal inofensivo, mesófilo típico que cresce na faixa de temperatura de 7°C à 37°C, sendo que algumas cepas enteropatogênicas crescem a 4°C. As cepas patogênicas são classificadas de acordo com a sua ação no hospedeiro, podendo ser enteropatogênicas (EPEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC), enterohemorrágicas (EHEC), enteroagregativas (EaggEc), uropatogênicas (UPEC), neonatalmeningite (NMEC), e facultativamente enteropatogênicas (FEEC) (JAY, 1994; FRANCO e LANDGRAF, 1996).

A presença de *Escherichia coli* em um alimento é um fato alarmante. Por ser uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae* e uma vez detectada no alimento, indica contaminação bacteriana de origem fecal e, portanto está em condições higiênicas insatisfatórias (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

Dentre as bactérias causadoras de doença diarréica, uma das mais incriminadas é a *Escherichia coli*. Ela é um microrganismo da microbiota do cólon de mamíferos que pode determinar síndromes clínicas com importância epidemiológica, como infecção urinária, septicemia/meningite e doença diarréica (TAYLOR e BETTELHEIM, 1966).

2.2.1.2 Síndromes gastroentéricas

Os primeiros estudos sobre a diarréia por *E.coli* foram realizados em ocasião de uma epidemia que ocorreu em uma creche infantil nos meados dos anos 40, provocando uma mortalidade de 50% dos indivíduos infectados (JAY, 1994). Já foram comprovados que alguns isolamentos produziam respostas na prova de alça intestinal de coelho parecidas com as que produziam o *Vibrio Cholerae*. Estes achados conduziram estudos de *E.coli* como possível agente etiológico de enfermidades semelhantes à cólera na Índia. Sack, 1975 menciona que as primeiras referências de cepas produtoras de enterotoxinas em animais jovens com diarréia apareceram em 1967, e em 1970 descobriu que as cepas virulentas produziam enterotoxinas.

As cepas de *E.coli* são importantes como possíveis patógenos transmitidos por alimentos, se encontram nas fezes e em geral têm ampla distribuição, embora em pequenas quantidades, nos ambientes onde se encontram os alimentos. Como microrganismo indicador, a presença de *E.coli* nos alimentos em quantidades elevadas é utilizada para indicar a possibilidade de contaminação fecal e da presença de outros microrganismos enteropatogênicos. Como microrganismo potencialmente patogênico transmitido por alimentos, as reduzidas quantidades, geralmente aceitáveis, adquirem novo significado, em especial quando as condições do meio em que se encontra permitem sua multiplicação (FRANCO, 2002).

O potencial toxigênico de *E.coli* foi descoberto na década de 60 quando se demonstrou que certos isolados de crianças com diarréia causavam secreção de

fluidos no modelo experimental de alça intestinal de coelho (TAYLOR e BETTELHEIM, 1966). O fato podia ser observado ainda que a cultura bacteriana fosse tratada com clorofórmio, sugerindo a presença de enterotoxinas. A importância clínica da infecção humana por ETEC foi estabelecida na década de 70, a partir da identificação desses microrganismos como causa de diarreia endêmica na Ásia (SACK, 1975). ETEC é também capaz de causar diarreia em diversos animais domésticos, comumente suínos (ibid, 1975).

Cepas de *E.coli* considerada EPEC pertencem a um número restrito de sorotipos. Os sorogrupos O26, O55, O86, O11, O114, O119, O125, O126, O127, O128ab, O142, O158 incluem sorotipos de EPEC. A diarreia por elas provocada é, clinicamente, mais grave do que aquelas provocadas por outros patógenos, sendo geralmente, acompanhada de dores abdominais, vômitos e febre, com duração de seis horas a três dias, cuja incubação varia entre 17 e 72 horas (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

2.2.1.3 Significado da presença de *E.coli* em pescado.

A presença de bactérias do grupo coliforme em moluscos filtradores é uma ocorrência mundial, pois as zonas costeiras (baías e enseadas) são os melhores locais para a reprodução e crescimento dos bivalves, e geralmente nessas áreas ocorre escoamento de esgotos e desembocadura de rios que trazem consigo contaminantes biológicos e químicos, cuja concentração interfere na qualidade do molusco (EPAGRI, 1994).

Dentro do grupo dos coliformes fecais a *Escherichia coli* é a mais conhecida, apesar de também poder ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais, ainda é o melhor indicador de contaminação fecal (SILVA et al. 1997).

Segundo Wood (1996), a colimetria de águas provenientes de áreas onde são coletados bivalves destinados ao consumo, constitui-se subsídio científico útil para as autoridades sanitárias envolvidas na fiscalização e controle da qualidade desses alimentos, tendo em vista que é um motivo de preocupação o fato de os mesmos serem consumidos crus ou mal cozidos.

A determinação de coliformes de origem fecal nos tecidos moles e líquido intervalvar, para avaliar a qualidade dos moluscos, apresenta maiores possibilidades como padrão de normatização no cultivo, do que a análise da água das áreas produtivas (MACHADO et al. 2001)

Casas e Hipólito (1993), verificaram elevados níveis de coliformes fecais em amostras de moluscos bivalves, tais como o berbigão, com variação de contaminação, dependendo do local de captura, quanto mais próximo a centro urbano, maior contaminação devido ao ecossistema que recebe maior carga de dejetos domésticos e industriais.

2.2.1.4 Epidemiologia

As bactérias pertencentes ao grupo ETEC são importantes causas de diarreia em países em desenvolvimento. Nas regiões endêmicas, onde as condições de saneamento são precárias, principalmente nos trópicos, a doença atinge pessoas de todas as faixas etárias, sendo considerados um dos principais agentes etiológicos da chamada “diarreia dos viajantes”, acometendo indivíduos que se locomovem de área desenvolvidas para regiões com problemas de saneamento básico. Nos EUA e na Europa, ETEC raramente é isolada em casos de diarreia esporádica, embora ocasionalmente surtos tenham sido registrados. Esses surtos ocorrem devido ao consumo de água ou de alimentos contaminados com ETEC (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

Estes mesmos autores ainda relatam que as cepas EIEC acometem mais comumente crianças e adultos, contudo o seu isolamento de pacientes com diarreia não é freqüente. Alguns estudos têm apontado surtos relacionados com a ingestão de água e/ou alimentos contaminados com EIEC, envolvendo principalmente o sorogrupo O124. Entretanto, acredita-se que a via de transmissão mais comum seja o contato interpessoal.

O bovino é considerado reservatório natural de EHEC, razão pela qual os alimentos de origem animal principalmente a carne bovina parecem ser o principal veículo deste patógeno. Diversos surtos de colite hemorrágica ocorrido nos Estados Unidos, Canadá e Japão foram claramente associados com consumo de

hambúrgueres. Por isso, a síndrome provocada por EHEC tem recebido a denominação de “doença do hambúrguer” (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

Doenças diarréicas de origem bacteriana são a causa mais comum de enfermidade e morte em crianças de países em desenvolvimento e ETEC é um dos patógenos predominantes associados a esse tipo de doença (BLACK et al. 1989). Nessas áreas, crianças abaixo de três anos sofrem em média 2 ou 3 episódios de diarreia por ETEC anualmente, o que representa 25% de todas as doenças diarreicas (ibid,1989). A incidência de infecção declina com a idade e, nas regiões endêmicas, é pouco comum em adultos, indicando que a aquisição de imunidade tem papel importante na proteção contra a doença. Já em países desenvolvidos, ETEC é raramente isolada de casos de diarreia, o que pode ser atribuído ao fato de não ser prevalente no ambiente e á alta dose infectiva necessária para causar doença (BLACK, 1990). Habitantes de países industrializados que se dirigem para regiões menos desenvolvidas são freqüentemente acometidos pela chamada diarreia dos viajantes da qual ETEC é a causa mais comum (ibid, 1990).

A Comissão Nacional de Energia Nuclear (1996) estima que nos EUA ocorram, anualmente, entre 6,5 e 33 milhões de casos de diarreia ocasionados por alimentos. Cerca de 9000 dessas ocorrências resultam em óbitos. O grande número de casos recentes de diarreia e morte causados pela bactéria *Escherichia coli* O157:H7, tem chamado atenção para esse patógeno, que afeta 7000 a 20000 americanos causando um custo anual, relativo a tratamentos, estimado entre 174,3 e 460 milhões de dólares .

2.2.2 ENTEROCOCCUS

2.2.2.1. Taxonomia e características culturais

Pelo método de coloração de Gram, o *Enterococcus* aparece como um coco Gram positivo que se agrupa aos pares, cadeias curtas ou células isoladas, possui habilidade em crescer em meio contendo NaCl a 6,5%, em temperaturas entre 10-45°C, sobrevive por 30 minutos a 60°C, hidrolisa esculina e L - pyrrolidonyl b – naphthylamide (PYR), reage com antisoro de Estreptococo do grupo D. Os *Enterococcus* são organismos anaeróbios facultativos e, como os estreptococos não

têm enzimas citocromias e são catalase negativos, embora, algumas cepas possam produzir pseudocatalase (UNIFESP, 2002).

Atualmente são conhecidas dezesseis espécies: *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. saccharolyticus*, e *E. sulfureus* (ibid, 2002).

Segundo Frazier e Westoff (1993), os *Enterococcus* procedem do tubo intestinal do homem e dos animais, tendo utilizado às vezes como microrganismos indicadores de contaminação fecal dos alimentos, e também para determinar as condições de limpeza de uma determinada planta industrial.

Os *Enterococcus* são capazes de crescer tanto a 10°C como a 45°C, são termodúricos, por resistirem com facilidade à temperatura de pasteurização, toleram concentrações de sal de 6,5%, são capazes de crescer em pH básico no valor 9,6 (ibid, 1993).

A utilização dos *Enterococcus* como indicadores de contaminação fecal dos alimentos apresenta algumas restrições, pois também são encontrados em diferentes ambientes do trato intestinal e além disso, apresentam sobrevivência maior do que os enteropatógenos no solo, vegetais e em alimentos, principalmente naqueles submetidos à desidratação, ação de desinfetantes e a flutuações de temperatura por serem mais resistentes (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

2.2.2.2 Significado da presença de *Enterococcus* em pescado.

Inúmeros agentes bacterianos podem, ainda, contaminar o pescado e causar risco à saúde, dentre eles, os *Enterococcus* e os coliformes fecais, podendo ser encontrados nos peixes frescos ou congelados, nos frutos do mar e nos produtos industrializados, estando a maioria destes relacionados com a qualidade da água, principalmente do gelo utilizado na conservação, e/ou procedimentos pós - captura (GERMANO e GERMANO, 2001)

Os *Enterococcus* são freqüentemente empregados como “indicadores complementares” do grupo coliforme na determinação da contaminação fecal. A

relação existente entre as contagens de coliformes fecais (CF) e *Enterococcus* fecais pode indicar se a contaminação recente é de origem humana ou animal (HAGLER e HAGLER, 1988).

Apesar das limitações do uso desses microrganismos como indicadores de contaminação fecal, sua presença em números elevados em alimentos, indica práticas sanitárias inadequadas ou exposição do alimento a condições que permitiram a multiplicação de microrganismos indesejáveis (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

2.2.2.3. Síndromes gastroentéricas

Segundo Franco e Landgraf (1996), o período de incubação da enfermidade causada pelo *Enterococcus* varia de duas a 20 horas e os principais sintomas encontrados são vômitos, dor abdominal e diarreia.

Trabulsi (1989), relata que os *Enterococcus* são normalmente encontrados no intestino humano e também são agentes de vários tipos de infecção, dentre elas; endocardite e infecção urinária.

2.3 IRRADIAÇÃO DE ALIMENTOS

Durante cerca de duas décadas os trabalhos de pesquisa em irradiação de alimentos ficaram restritos ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA - USP). Atualmente diversos centros de pesquisas avançam e realizam estudos em alimentos como cereais, frutas, hortaliças, carne de frango, peixes e especiarias. Entretanto, o comércio de alimentos irradiados no Brasil ainda não despontou e a única experiência comercial aconteceu em meados dos anos 80, com a exportação de especiarias irradiadas (FERREIRA, 1999).

Atualmente no Brasil, existem algumas empresas que utilizam o processo de irradiação em produtos com aplicação na área médica e que eventualmente podem usar seus irradiadores para a irradiação de alimentos. Dentre elas podem-se destacar a Empresa Brasileira de Radiações (EMBRARAD), e a Companhia Brasileira de Esterilização (CBE).

A aceitação pública do conceito da irradiação de alimentos, entretanto, não tem sido muito entusiasmada em alguns países. O pavor da guerra nuclear e acidentes com os ocorridos em “Three Miles Island”, nos EUA e em Chernobyl, na ex-URSS, deram motivos a que muitos desconfiem do uso da energia nuclear com o propósito que for, mesmo que se trate de algo tão conveniente como a melhoria da quantidade e qualidade dos alimentos. Esta desconfiança baseia-se na falta de informação e na confusão entre o processo de irradiação e a contaminação radioativa (OMS, 1989).

Não existe, de acordo com Mossel (1987) razões científicas ou tecnológicas para a falta de uma intensa utilização da irradiação na indústria de alimentos.

Após décadas de pesquisa, desenvolvimento, debate público, testes de aceitação de alimentos irradiados em muitos países e estudos de viabilidade econômica, a irradiação apresenta-se como boa alternativa para propiciar a segurança e qualidade de alimentos e para combater doenças de origem alimentar (LOAHARANU, 1997).

No início das pesquisas sobre irradiação de alimentos, os tratamentos que visavam objetivos microbiológicos, foram caracterizados em dois grupos segundo Diehl, (1990):

a) Pasteurização pela radiação, cujo objetivo era destruir somente parte da população microbiana, retardando o início da deterioração dos alimentos ou eliminando um grupo particular de microrganismos importantes para a saúde pública.

b) Esterilização pela radiação, objetivando a obtenção de alimentos indefinidamente estáveis, pela máxima ou total redução de todos os microrganismos.

Por várias razões a terminologia anteriormente citada era considerada insatisfatória. A esterilização pela radiação não poderia ser igualada à esterilização pelo calor, porque a radiação não inativa vírus na mesma proporção que o calor e, o uso da palavra pasteurização para designar dois tratamentos diferentes, mostrava-se ambíguo. BRASIL, (1968) ; DIEHL, (1990); WHO, (1994).

Assim em 1964, na tentativa de classificar o processo de irradiação de alimentos, foram propostos os termos radicação, radurização e radapertização, até hoje poucas vezes utilizados na literatura.

A esterilização pela radiação passou a corresponder pelo processo de apertização, proposto por Appert em 1809, em que o produto é considerado “comercialmente estéril”, induzindo então ao termo radapertização para o correspondente processo por radiação. A expressão “radiação - pasteurização” foi desmembrada em radicação, por analogia ao termo bactericida e, radurização, implicando em idéia de alimento mais durável, conforme explicitado abaixo:

RADICAÇÃO: relacionado à desinfestação e à destruição de bactérias e parasitas, este termo refere-se ao tratamento dos alimentos com aplicação de uma dose de energia ionizante na faixa de 2 a 8kGy, suficiente para reduzir o número viável de bactérias patogênicas não esporulantes, de interesse para a saúde pública, a um nível tal que nenhuma seja detectável no alimento tratado, quando este é examinado por qualquer método bacteriológico conhecido.

Também conhecido como radiopasteurização, pode ser aplicado na conservação de suco de frutas, no controle de *Salmonella* spp., de aves e ovos e no retardo da deterioração de peixe provocada por *Pseudomonas* spp., entre outros microrganismos (BRASIL, 1968). Este processo é referenciado como “*Salmonella Radication*”, quando é utilizado especificamente para eliminar microrganismos enteropatogênicos e enterotoxigênicos pertencentes ao gênero *Salmonella* (DIEHL, 1990).

RADURIZAÇÃO: é a aplicação aos alimentos de uma dose de radiação ionizante, em torno de 0,4 a 10kGy, suficiente para reduzir o número de microrganismos patogênicos contaminantes e promover a desinfestação de insetos prejudiciais aos alimentos, aumentando assim sua qualidade e prolongando o período de armazenamento, sem alterar características sensoriais. Este processo é considerado ideal para aplicação em produtos que são consumidos *in natura*, pode ser também utilizados para conservação de frutos do mar, frutas secas e alguns produtos cárneos (ESPANHA, 1967).

RADAPERTIZAÇÃO: o termo radapertização corresponde ao alimento caracterizado como “comercialmente estéril”, uma vez que a radiação dentro de uma faixa de dose acima de 10kGy, considerada alta pelos especialistas, é aplicada com o objetivo de reduzir o número e/ou a atividade dos microrganismos patogênicos, de tal modo que muito poucos ou nenhum, com exceção dos vírus, sejam detectáveis pelos métodos de análises preconizados, independente do tempo e em que condições o alimento seja armazenado, desde que seja devidamente embalado (ibid, 1967).

Alimentos são submetidos à doses de radapertização, como pescado, carnes cruas e cozidas, produtos vegetais, alimentos desidratados, sal, açúcar, ervas, especiarias entre outros. Doses altas acima de 10kGy, esterilizam alimentos para uma grande variedade de usos, como alimentos de astronautas durante viagens espaciais, de pacientes imunocomprometidos hospitalizados (ADA REPORTS, 1996; PSZCZOLA, 1997; OLSON, 1998), por alpinistas, velejadores e outros desportistas (DIEHL, 1990).

Os alimentos irradiados são seguros do ponto de vista toxicológico, mesmo quando aplicadas doses acima de 10kGy (WHO, 1999).

Normalmente, quanto maior o número de microrganismos maior será a dose necessária à destruição; os microrganismos apresentam maior resistência quando irradiados em meios protéicos, em ausência de oxigênio ou ainda, em células desidratadas ou em meios congelados (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

Por ordem crescente de sensibilidade, a literatura aponta que as bactérias Gram negativas, tanto as deteriorantes quanto às patogênicas são geralmente mais sensíveis que as células vegetativas de bactérias Gram positivas e estas, mais sensíveis que os esporos de *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp. (DIEHL, 1990).

Quando uma população de microorganismos é irradiada com uma dose baixa somente algumas células são danificadas ou mortas. Com o aumento da dose de radiação o número de sobreviventes diminui. A sensibilidade das bactérias é medida através da dose D_{10} , que é uma dose requerida para matar 90% da população (OLSON, 1998)

Os camarões também mostram resultados positivos em relação à redução do número de microrganismos com aplicação de doses entre 1 e 3 kGy (WHO, 1994).

Harewood et al. (1994), estudando os efeitos da radiação gama na vida útil e na carga microbiana e viral dos mexilhões, com doses menores a 5kGy, a taxa de mortalidade e inativação de células bacterianas vegetativas foi rápida, mas a população viral minimamente reduzida. Uma taxa de sobrevivência muito baixa foi evidenciada após exposições com doses maiores ou iguais a 0,5kGy.

O uso de irradiação em pescados e mariscos vem sendo bastante estudado, pois é elevado o número de pessoas que tem o hábito de ingerir estes alimentos crus ou incorretamente cozidos, e que tem sido responsável por altas taxas de mortalidade. O tempo de conservação do pescado é muito limitado, dificultando sua estocagem. Nos peixes e demais produtos marinhos comestíveis têm-se identificado inúmeros microrganismos patogênicos, os quais se encontram principalmente em águas contaminadas e no pescado incorretamente manipulado e armazenado. O pescado deve ser tratado no menor espaço de tempo possível após a captura. O tratamento de peixes e frutos do mar a bordo, com radiações ionizantes com doses variam de 1 a 7 kGy (para mariscos frescos ou congelados), duplica ou triplica o tempo de conservação (GERMANO e GERMANO,2001).

Valente (2002) observou que a irradiação de mexilhões congelados com dose de 2kGy, foi eficaz na redução da microbiota de bactérias mesófilas e psicotróficas, entretanto, mais sobre as bactérias psicotróficas.

Marins (2003) irradiou carne de rã congelada e refrigerada, e observou alta redução no número de microrganismos (mais de 90%) da população inicial foi destruída.

Dias (2002) relata que em amostras de ostras irradiadas e congeladas foi observado uma extraordinária eficácia abaixo de $0,25 \times 10^2$ UFC por grama.

Siqueira (2001), constatou que a dose de 2,2 kGy utilizada em tilápia não apresentou tal efetividade em função da carga bacteriana para coliformes fecais(*E.coli*).

Segundo CNEM (1996), o aumento atual de doenças causadas por *Escherichia coli* em hambúrguer é sério. Somente essa bactéria causa, seguramente, entre 8.000 a 20.000 casos anuais de doença nos EUA. A análise de resultados mostrou que doses abaixo de 0,6 kGy podem reduzir em mais de 90% a população desses patogênicos.

Amostras de camarões (*Litopenaeus brasiliensis* e *Litopenaeus paulensis*) foram submetidas a doses de radiação gama de 0; 1; 2; 2,5; 3 e 3,5 kGy e, posteriormente, mantidas sob refrigeração. As análises microbiológicas foram realizadas nos dias 0, 2, 4, 7, 10 e 14 pós processamento. Os coliformes termotolerantes apresentaram uma faixa de variação de 3,0 a 9,3.10 NMP/g. O número de psicotróficos em todas as amostras variou de 2,0 a 8,8 log UFC/g e o número de mesófilos entre 1 a 6,03 log UFC/g (MAYER, 2000).

As médias dos NMP de coliformes fecais nas amostras de carne de rã testemunha, 2kGy, 5kGy e 7kGy foram, respectivamente 1,28 log NMP/g, 1,11 log NMP/g, 0,92 log NMP/g e 0,36 log NMP/g (MARINS, 2003).

2.4. ASPECTOS HIGIÊNICO-SANITÁRIOS DE MOLUSCOS BIVALVES E A SAÚDE DO CONSUMIDOR.

Jay (1991), avaliando *E. coli* e *Enterococcus* como indicadores da qualidade sanitária de alimentos, constatou que os coliformes (*E.coli*) são mais fáceis de serem isolados e identificados, além de estarem mais relacionados a infecções intestinais do que os *Enterococcus*, embora esses últimos sejam mais resistentes às condições ambientais adversas, ao congelamento e sobreviverem mais tempo em alimentos congelados.

A presença de coliformes indica as condições higiênico-sanitárias da indústria e as condições de estocagem do produto. Os coliformes típicos são classificados nos gêneros *Escherichia* e *Enterobacter* sendo que a *E. coli* é considerada indicador clássico de contaminação fecal por ter como seu "habitat" preferencial o trato intestinal dos animais (OLIVEIRA, 1996).

Pereira (1998) menciona que para eliminar a influência negativa da presença de agentes poluentes e contaminantes microbianos, que tanto pode prejudicar a qualidade do pescado quanto à saúde do consumidor, recomenda-se a análise da

qualidade da água do mar e/ou dos moluscos bivalves através da enumeração de coliformes fecais ou *Escherichia coli*.

De acordo com Wood (1996), o exame periódico da qualidade microbiológica da água e dos moluscos bivalves, pode indicar a presença de microrganismos patogênicos. Os bivalves filtradores são utilizados como indicadores para a saúde pública no que se refere ao controle de toxinfecções alimentares e em casos de notificação, deve-se restringir seu consumo e comércio até que se obtenha o resultado das análises microbiológicas.

A captura e o processamento de ostras e mexilhões são na maioria das vezes realizados por pessoas de baixa renda. Os métodos usados são rudimentares e o produto é exposto às ações dos ventos, chuva e sol, sem a preocupação com higiene, proporcionando risco de contaminação. A avaliação microbiológica torna-se então, um instrumento importante para a prevenção de doenças veiculadas por estes moluscos filtradores (FERREIRA, 1995).

O pescado deve ser capturado em áreas sanitariamente garantidas, sobretudo o molusco, por funcionar como verdadeiros filtros de águas onde se encontram submersos. Embora a contaminação primária do pescado, a partir de ecossistemas aquáticos contaminados tenha sido relatado por diversos pesquisadores, o manuseio após a captura, representado pelas etapas de beneficiamento, conservação e armazenamento, é referido como fator determinante da qualidade microbiológica do produto final (CARNEIRO e VIANA, 1998; GERMANO, OLIVEIRA e GERMANO, 1993).

Jay (1978) (apud KUEH, CHAN, 1985)¹ relata que as bactérias responsáveis pela deterioração de moluscos bivalves são derivadas principalmente de sua microbiota normal.

A temperatura da água tem naturalmente um efeito seletivo; assim, os organismos psicrotróficos (*C. botulinum* e *Listeria* sp.) ocorrem no Ártico e nos climas mais frios, enquanto que os tipos mesófilos (*V. cholerae* e *V. parahaemolyticus*) representam parte da microbiota natural do pescado de

¹ KUEH, C. S. W.; CHAN, K.Y. Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. *Journal of Applied Bacteriology*, v.59, p. 41-47, 1985.

ambientes costeiros e estuários de zonas temperadas ou tropicais quentes. Contudo, deve ser realçado que todos gêneros de bactérias patogênicas mencionadas anteriormente contém estirpes ambientais não patogênicos (HUSS, 1997).

É importante determinar se os patógenos humanos que vêm sendo introduzidos no meio aquático podem se multiplicar entre peixes e mariscos e, igualmente, estimar a sua importância epidemiológica. Pesquisas já realizadas têm mostrado que espécies de *Salmonella*, *Pasteurella*, *Leptospira*, *Vibrio*, *Mycobacterium* e *Nocardia* podem se abrigar e se reproduzir nesses organismos, aumentando as fontes de reinfecção humana. Certas espécies de *Vibrio*, como *V.vulnificus* podem estar associadas à elevada mortalidade (>50%) verificada entre pessoas imunocomprometidas ou que sofram de doenças hepáticas (FAO, 1974).

Moluscos bivalves comercializados em Hong Kong foram coletados em águas costeiras, onde prevalecia uma considerável diluição por água doce e alta carga de nutrientes. A população de bactérias heterotróficas nestas áreas foi caracterizada por uma mistura de espécies marinhas, de água doce e do solo, adaptadas ao ambiente organicamente rico (KUEH e CHAN, 1985).

Peixes, mariscos e crustáceos são fontes de alimentos possuidores de componentes altamente desejáveis para uma dieta saudável. Entretanto por fatores diversos, podem se tornar potencialmente de risco para a saúde do consumidor. Em países do primeiro mundo, como nos Estados Unidos da América (EUA), onde há monitoramento constante do produto oferecido no mercado, bem como das condições locais de procedência, o maior risco da doença aguda está associado ao consumo *in natura*, particularmente de moluscos bivalves. Em países onde o pescado está associado a áreas de risco, os seres humanos estão conseqüentemente, expostos a problemas de saúde. Com base nesta afirmativa, a contaminação dos mexilhões por bactérias, é um problema importante, principalmente em criações e áreas de extrativismo situadas próximo a aglomerados urbanos. Os mexilhões, como demais bivalves, possuem a característica de reter e concentrar organismos patogênicos, agentes de doenças graves, como tifo, cólera, tuberculose e hepatite, motivo pelo qual devem ser submetidos a um tratamento de depuração, antes de serem comercializados (MARQUES e PEREIRA, 1988).

O maior problema na comercialização do mexilhão foi sempre a falta de garantia da sua qualidade, já que os grupos extratores de uma maneira geral, não observam normas de higiene e sanidade do produto. Tais condições inadequadas podem ter origem na extração em áreas não recomendáveis, no alto grau de poluição dos bancos mexilhoneiros, no processo de beneficiamento e embalagem, incluindo o tempo entre sua extração/cocção/ consumo. O produto é vendido sem identificação de produtor e de origem. Notícias sensacionalistas veiculadas pelos veículos de comunicação, por vezes, contribuem para aumentar o receio dos consumidores, elevando, assim, os prejuízos da comunidade de marisqueiros (TEPER, 1998).

A existência dos Serviços de Inspeção traduz-se na necessidade da observância de normas, padrões e legislações compatíveis com a realidade de cada país, com os objetivos de zelar pela saúde do consumidor, garantir o comércio legal, reduzir as perdas e oferecer condições para a aceitabilidade do pescado e seus derivados. O exercício da inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal objetiva o combate às enfermidades que podem atingir o consumidor, e também a defesa da qualidade desse produto. Esta é exercida através da supervisão do controle dos pontos críticos nas linhas de industrialização, e da luta contra o desperdício de matéria-prima e dos produtos finais especialmente nos países em desenvolvimento (FAULHABER, 1988).

2.5 LEGISLAÇÃO

Com referência a legislação deve-se ressaltar a existência de padrões nacionais e internacionais que definem as características microbiológicas do pescado em estudo e do método de conservação utilizado pela pesquisa.

A Legislação Nacional, RDC nº 12 de 02 de Janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001b), estabelece que o limite de tolerância para coliformes a 45 °C ou termotolerantes é de 5×10^4 para moluscos cozidos, refrigerados ou congelados. Com relação ao *Enterococcus*, não existe padrão microbiológico, entretanto, no ANEXO II desta mesma legislação, fica mencionado que: “PRODUTO ou LOTE (se a amostra indicativa ou representativa, respectivamente), IMPRÓPIO PARA CONSUMO HUMANO POR APRESENTAR...

(microrganismo patogênico ou toxina que representa perigo severo a saúde do consumidor)”.

Em 29 de agosto de 1973, através do Decreto nº 72.718, o governo brasileiro estabelece normas gerais sobre irradiação de alimentos, relatando que poderiam ser utilizadas nos alimentos as radiações ionizantes, em geral, cuja energia fosse inferior ao limiar das reações nucleares que poderiam induzir radioatividade no material ionizado (BRASIL, 1973).

A Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) ficaria responsável pelo registro de equipamentos destinados às operações de irradiação, às condições de funcionamento e aos processos tecnológicos a serem observados pelos estabelecimentos licenciados. Os alimentos deveriam indicar, em sua embalagem, que foram tratados por irradiação: “Alimento Tratado Por Irradiação” (BRASIL, 1973).

As Portarias do DINAL nº 09 de 08 de março de 1985 e nº 30 de 25 de setembro de 1989 seguiram no sentido de apresentar os alimentos aprovados para a irradiação e as doses a serem utilizadas para arroz, feijão, batata, trigo, especiarias, frutas, peixes, aves, etc. (BRASIL, 1985; BRASIL, 1989). Entretanto, em 26 de janeiro de 2001, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução RDC/ANVISA/MS nº 21, criou novos regulamentos para alimentos irradiados revogando as Portarias anteriores. A principal mudança relaciona-se com as doses absorvidas pelos alimentos:

“A dose mínima absorvida deve ser suficiente para alcançar a finalidade pretendida e a dose máxima absorvida deve ser inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais e/ou os atributos sensoriais do alimento” (BRASIL, 2001a).

2.6 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS

Nos últimos anos tem crescido de forma indiscriminada o uso de agentes antimicrobianos nas rações animais, fato este que tem levado ao surgimento de microrganismos resistentes o que tem contribuído para a não eficácia destes produtos na prática terapêutica. Por esta razão tornou-se necessário investigações sobre o comportamento das bactérias frente aos antimicrobianos, como nas pesquisas realizadas por WONG et al. (1988).

A resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos pode ser uma característica natural das várias espécies de bactérias ou ser adquirida por cepas individuais dentro de uma população sensível (TAVARES, 1990).

Na produção animal, os antibióticos têm sido utilizados com duas finalidades principais, como aditivos em rações para maior desenvolvimento e conseqüentemente funcionando como promotores de crescimento; e prevenção ou tratamento de doenças específicas, administrados por via parenteral, oral ou misturados às rações (VALLE, 1985).

A utilização dos antimicrobianos gerou grande otimismo em relação a prevenção e ao tratamento dos processos infecciosos. Entretanto, o uso exagerado e nem sempre criterioso ou racional dos antibióticos e quimioterápicos trouxe dificuldades, sendo a maior delas representada pela progressiva resistência bacteriana às drogas (MONTELLI e SADATSUNE, 2001).

O uso de antibióticos de forma indireta e em longo prazo, devido à grande exposição de microrganismo a essas drogas, pode dar origem a seleção de cepas resistentes que poderá ser transferida entre bactérias (TAVARES, 1990).

É de domínio público que os antibióticos têm sido valiosos instrumentos na luta contra os microrganismos. Porém, muitas cepas adquiriram resistência aos agentes antimicrobianos e transferiram-na às gerações posteriores (GUILLLOT et al. 1977).

Meng et al. (1998) relataram que o desenvolvimento de resistência pelas bactérias patogênicas é inevitável, em conseqüência do uso clínico das drogas antimicrobianas. O uso excessivo de antibióticos para o tratamento de doenças animais, a aplicação subterapêutica de agentes antimicrobianos para a prevenção de doenças, promoção de crescimento e eficiência alimentar em animais de criação têm acelerado a emergência de bactérias resistentes, que podem ser transferidas para humanos através da cadeia alimentar.

A concentração inibitória dos antimicrobianos (antibiograma) pode ser determinada direta ou indiretamente. A determinação direta é feita pelos chamados métodos de diluição e a indireta pelo método do disco (método de Bauer e Kirby). A

capacidade de adquirir resistência, bem como o grau adquirido, são propriedades variáveis entre as bactérias (TRABULSI, 1989).

Montelli e Sadatsune (2001) em estudos recentes demonstraram que 95% de todas as cepas isoladas de material patológico são sensíveis ou resistentes. Por outro lado nos Estados Unidos apenas 21% dos laboratórios medem as zonas com precisão e a maioria dos clínicos, por medida de segurança, considera os resultados intermediários como resistentes.

2.6.1 *ESCHERICHIA COLI*

As cepas de *Escherichia coli*, isoladas de alimentos, têm apresentado multiresistência antimicrobiana e em trabalhos desenvolvidos por Montelli e Sadatsune (2001), revelaram que amostras de enterobactérias produtoras de betalactamase de espectro estendido, principalmente *Klebsiella pneumoniae* e *E.coli*, podem ser clinicamente resistentes a terapêutica com penicilinas, cefalosporinas (ceftriaxona, cefotaxima e ceftazidima) ou aztreonam, mesmo quando ocorrer “aparente” sensibilidade ao antibiograma a algumas destas drogas.

Coliformes antibiótico-resistentes podem ser importantes não só por sua potencialidade de patogenia como por transmitirem resistência para outras bactérias patogênicas (COOKE, 1985)

Campos e Trabulsi (1999) advertiram: “sempre que for indicado o uso de antibiótico para infecções por EPEC, o antibiótico deve ser selecionado pelo antibiograma”, uma vez que os sorotipos mais freqüentemente isolados são resistentes à maioria dos antibióticos.

Em pesquisa realizada pelo laboratório central de Assunção - Paraguai, durante quatro anos, foram concluídos 938 diagnósticos clínicos de diarreia em crianças menores de cinco anos, nos quais foram detectados 11 casos de EIEC. Nesses casos foi observado aumento de resistência de diferentes tipos de antimicrobianos, exceto para fluoroquinona, que não é usada para tratamento pediátrico. Por isso faz-se necessária a vigilância apropriada e o uso de antibioticoterapia específica nos casos clínicos (ORTELLADO et al.1999)

Franco et al. (1985) isolaram cepas enteropatogênicas em amostras de alimentos de origem animal e observaram que algumas foram resistentes a um ou mais antibióticos, sendo a maioria sensível aos antimicrobianos estudados.

Meng et al. (1998) determinaram a resistência de 125 cepas de *Escherichia coli*, de dois diferentes sorotipos isolados de animais, alimentos e humanos concluíram que 30 (24,0%) apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico e 24 (19,0%) resistentes a três ou mais antibióticos, e 70% das cepas apresentaram resistência à estreptomicina, sulfisoxazole e tetraciclina.

2.6.2 ENTEROCOCCUS

Dentre estas espécies de *Enterococcus*, o *E. faecalis* costuma ser responsável por aproximadamente 80 a 90% das infecções, enquanto que o *E. faecium* era responsável por menos de 5% das infecções enterocócicas (UNIFESP, 2002). Porém nos últimos anos, a prevalência de *E. faecium* tem aumentado especialmente em locais onde há alta prevalência de resistência a vancomicina (ibid 2002).

Em São Paulo, Cereda (2000) mapeou o perfil de resistência de bactérias *Enterococcus* na América Latina, detectou diversas formas resistentes a antimicrobianos no Brasil, mais precisamente em São Paulo. Ainda advertiu que, a taxa de a vancomicina entre as bactérias resistentes a várias drogas era de 3,7%. O antimicrobiano não determinou ação em 3,4% dos casos. Doze das amostras resistentes eram da espécie *E. faecium* e duas da *E. faecalis*. O estudo forneceu projeções estatísticas mostrando que no Brasil, 20% das amostras de *E. faecium* e 0,8% das de *E. faecalis* desenvolverão resistência a vancomicina.

Amostras de *Enterococcus* sp. cefalosporinas, aminoglicosídeos (exceto em altos níveis de resistência), clindamicina e sulfame-toxazol- trimetoprim podem parecer ativos “*in vitro*” mas não são efetivos clinicamente (MONTELLI e SADATSUNE, 2001).

A importância do *Enterococcus* se deve não somente a sua elevada frequência em infecções hospitalares nos últimos anos, mas também da sua capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos comumente utilizados e

que as amostras de *E. faecium*, tendem a ser mais resistentes aos antimicrobianos do que as amostras de *E. faecalis* (MURRAY, 1990). O mesmo autor relata ainda, que a pressão seletiva provocada pelo uso extensivo de cefalosporinas de amplo espectro, aminoglicosídeos e outros antimicrobianos com atividade limitada contra o *Enterococcus*, tem permitido que esse patógeno sobreviva e prevaleça entre as bactérias que colonizam o trato gastrointestinal de pacientes graves, imunossuprimidos e neutropênicos, conseqüentemente, a ocorrência de infecções graves por *Enterococcus* tem aumentado progressivamente, principalmente em hospitais terciários onde esse patógeno é responsável por um número importante de infecções que apresentam alta morbidade e mortalidade.

Segundo Cereda (2000), ficou constatado que, das 436 amostras, 16 eram resistentes a 10 antibióticos diferentes, inclusive a vancomicina, o mais potente para combater esses microrganismos.

Há dois tipos de resistência a vancomicina em *Enterococcus*; sendo o primeiro tipo de resistência intrínseca, encontrada em isolados de *Enterococcus gallinarum* e *E. casseliflavus*, que demonstram um baixo grau de resistência a vancomicina. O segundo tipo de resistência aos glicopeptídeos é à resistência adquirida. Os *Enterococcus* podem se tornar resistentes a vancomicina pela aquisição de informação genética de outros microrganismos. Mas comumente esta resistência é vista em *E. faecium* e *E. faecalis*, mas não tem sido detectadas em *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans* e várias outras espécies de *Enterococcus* (UNIFESP, 2002).

2.7 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial é definida como uma técnica científica utilizada para evocar, medir, analisar, aquelas características dos alimentos quando são percebidas pelos órgãos dos sentidos. A análise sensorial é considerada subjetiva, uma vez que depende dos órgãos dos sentidos, capacidade de julgamento do analista estando ainda sujeita a influência de fatores extremos de avaliação, como estado emocional e de saúde do analista, e do que este fez antes de iniciar a análise (BEIRÃO et al. 2002).

De acordo com o objetivo do teste, com o critério de seleção dos julgadores e com a tarefa específica de cada julgador, os testes sensoriais podem ser classificados em quatro tipos básicos: Afetivos, Discriminativos, Descritivos e de Qualidade (STONE e SIEDEL, 1995).

A avaliação sensorial de um produto é de grande importância para a apreciação de sua qualidade, embora ainda exista a idéia equivocada de que a análise dos alimentos deva ser realizada em laboratório químico ou microbiológico, havendo uma tendência de menosprezar a análise sensorial. Entretanto, as técnicas de avaliação sensorial são tão específicas como os outros métodos de análises. Atualmente, com o desenvolvimento da avaliação sensorial é possível analisar de forma científica e objetiva as características que influem na aceitabilidade de um produto pelo consumidor através do desenvolvimento de uma equipe sensorial (OLIVEIRA, 1996).

Segundo Morales (1994), os testes afetivos são aqueles em que o julgador expressa sua reação subjetiva diante do produto, indicando se gosta ou desgosta, se aceita ou rejeita ou se prefere um outro produto.

O mesmo autor, cita que é necessário em primeiro lugar, determinar se somente deseja-se avaliar preferência ou grau de satisfação (gostar ou desgostar), ou se também se quer saber qual é o grau de aceitação entre os consumidores, e que neste último caso, os questionários deverão conter não somente perguntas de preferência, mas também se a pessoa desejaria adquirir ou não tal produto.

Em pesquisas realizadas na China observou-se que a carne de peixe irradiada sofreu algumas mudanças sensoriais perceptíveis. Irradiou-se carne de peixe com doses de 1,5, 2,2 e 3,0 kGy em temperatura ambiente. A carne não irradiada permaneceu branca. A carne irradiada com doses de 1,5 e 2,2 kGy apresentou cor ligeiramente avermelhada. A carne irradiada a 3,0 kGy apresentou-se completamente avermelhada (YUEH-JEN et al. 1983).

Siqueira (2001) irradiou Tilápia (*Oreochromis niloticus*) e analisou os efeitos físicos, químicos, nutricionais e microbiológicos. A boa aceitação para a aparência, aroma, cor e textura obtida na análise sensorial dos produtos armazenados por um

período de 30 dias, mostrou a viabilidade do processo de irradiação combinado com a refrigeração tendo a intenção de estender a vida comercial das tilápias.

Irradiação de camarões congelados com dose de 10 kGy reduzem ácidos graxos polisaturado por 25-32%, possivelmente, devido a oxidação e decomposição de lipídios em componentes voláteis (HAU et al. 1992). Ainda relata que a dose limite de irradiação para desenvolvimento do sabor mais forte em camarões congelados foi de 4,5 kGy.

Características sensoriais de mexilhões machos e fêmeas cozidos foram analisadas separadamente em termos de seu aspecto, cor, odor, gosto e textura, através de um perfil de características hedônico, e tendo a variável gosto, apresentado diferença significativa (BEIRÃO et al. 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido, no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal e de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense e no Laboratório de Instrumentação Nuclear da COPPE na UFRJ.

3.1 MATERIAL

3.1.1 AMOSTRAS

As amostras de mexilhão foram adquiridas na Associação Livre de Maricultores de Jurujuba (ALMARJ), num total de 40 embalagens pré-cozidas e congeladas, sendo separadas em quatro grupos: um grupo controle de 10 amostras, um grupo de 10 amostras irradiadas com dose de 3kGy, um grupo de 10 amostras irradiadas com dose de 5 kGy e um grupo de 10 amostras irradiadas com dose de 7kGy.

O número representativo das amostras satisfaz as exigências de amostragem para diagnóstico analítico, em conformidade com o método de amostragem previamente descrito (DI GIACOMO e KOEPESELL, 1986; MARTIN et al. 1987). Tendo em vista que a prevalência de *Escherichia coli* e *Enterococcus* em pescado e derivados vem apresentando variação de 8,3% (VIEIRA et al. 2000; BATISTA e MEINRET, 1995), e valores de 1% a 6% (MORELLI et al. 2003), respectivamente.

3.2 MÉTODOS

A vidraria utilizada foi previamente esterilizada em forno Pasteur á 170°C por uma hora e as soluções e meios de cultura foram preparados e esterilizados em autoclave, conforme suas respectivas especificações.

3.2.1 CONTROLE DE QUALIDADE DOS MEIOS DE CULTURA

Todos os meios de cultura foram originários de laboratórios comerciais, e utilizados nas análises bacteriológicas, sendo sua esterilidade testada pelo Bioindicador Sterikon (Merck) que consiste, em uma ampola que contém caldo nutritivo, açúcar e um indicador de pH e esporos do germe não patogênico *Bacillus stearothermophilis* DONK (ATCC 7953), que funciona como o organismo de ensaio, aonde irá se comprovar a capacidade de germinação dos esporos, após esterilização em autoclave. A termoresistência do Sterikon – Bioindicador, corresponde a uma temperatura de esterilização de $121 \pm 0,5$ °C, onde os microrganismos contidos na ampola sobrevivem em torno de cinco minutos, porém são destruídos em torno de 15 minutos.

Os meios de cultura foram confeccionados em quantidades suficientes para o uso durante uma semana.

Com o objetivo de se observar o comportamento dos microrganismos deste presente trabalho, e de se testar a total eficiência de todos os meios de cultura utilizados nas diferentes fases, estes foram semeados com culturas padrões reconhecidas por órgãos internacionais, dentre elas: *Enterococcus faecium* INCQS 00071 – origem ATCC 6569, *Enterococcus faecalis* (*Streptococcus faecalis*) INCQS 00234 – origem ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* INCQS 00154 – origem ATCC 19433. E para *Escherichia coli* INCQS 00312 – origem UFF/NCBI – 86, *Escherichia coli* INCQS 00127 – origem ATCC 10799, *Escherichia coli* INCQS 00179 – origem CDC H27, *Escherichia coli* INCQS 00181 – origem CDC055, *Escherichia coli* O157 H:7 E – 40705 SH₁ – PHLS.

3.2.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a realização desta pesquisa foram utilizadas amostras de mexilhões pré-cozidos, congelados, e embalados em sacos de polietileno (Figura 1), provenientes da Associação Livre de Maricultores de Jurujuba (ALMARJ), Niterói-RJ.



Figura 1: Representação das amostras adquiridas para análise.

Foram adquiridas 40 amostras no total, pesando cada uma delas 500g. As amostras foram divididas em quatro grupos: um grupo constituído de 10 amostras controle, 10 irradiadas com dose de 3kGy, 10 irradiadas com dose de 5kGy e 10 com dose de 7kGy.

3.2.3 IRRADIAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram transportadas congeladas em recipiente isotérmico para o Laboratório de Instrumentação Nuclear da COPPE (Coordenação de Programas de Pós - Graduação em Engenharia), na UFRJ (Universidade Federal do Rio de Janeiro), na Ilha do Fundão, no município do Rio de Janeiro. Sendo estas divididas em quatro grupos: um grupo constituído de 10 amostras controle, que ficaram armazenadas no Freezer de marca Metal frio à temperatura de $- 8^{\circ}\text{C}$, do Laboratório de Controle Microbiológico de POA da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense. Os outros três grupos de 10 amostras irradiadas com dose de 3kGy, 10 amostras irradiadas com dose de 5kGy e 10 amostras irradiadas com dose de 7kGy (figura 2), que foram expostos à irradiação pelo irradiador Co 60 modelo

Gammacell Nordion - Canadá, com taxa de dose de 90 Gy/min, do Laboratório da COPPE anteriormente citado.



Figura 2: Espécimes irradiadas fêmeas (cor alaranjada) e machos (cor creme) e testemunhas.

3.2.4 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

O preparo das sub-amostras para as análises de *E.coli* e *Enterococcus* foram baseados em (MIDURA e BRYANT, 2001).

3.2.4.1 NMP de *Escherichia coli* (KORNACKI e JOHNSON, 2001) – Método I

Após a aplicação das técnicas de assepsia com álcool (70%) na bancada e na superfície da embalagem da amostra, foram pesados 25 gramas da amostra, sendo homogeneizado sem “stomacher” com 225mL de solução salina peptonada a 0,1%, obtendo-se diluição 10^{-1} . Desta diluição foram retirados 10mL e diluídos em 90mL de solução salina peptonada a 0,1%, obtendo-se a diluição 10^{-2} . Este procedimento foi repetido até obtenção da diluição 10^{-4} para amostras controle e 10^{-3} para as amostras irradiadas. As diluições foram inoculadas em três séries de três tubos contendo o meio “Fluorocult LMX Broth” –Merck nº 10620, no volume de 10mL, com incubação a 35 – 37°C/ 24 – 48 horas.

Após a incubação foi realizado o cálculo do Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais (*E.coli*) com base na tabela de Mac Crady.

O cálculo do NMP de coliformes totais foi procedido nos tubos que tiveram alteração da coloração do caldo de amarelo para verde-azulado. O 1-isopropil - β -D

-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) atua como substância intensificadora na síntese enzimática β - D - glucoronidase formando 4 - metilumbeliferona (4 - UM) a qual possui fluorescência azul quando irradiada com luz ultravioleta de onda longa (366nm) (MANAFI et al., 1991 e OSMER, 1993) No caso da *E.coli*, os tubos que apresentaram alteração da cor do meio foram iluminados sob luz de lâmpada ultravioleta de 366nm de comprimento de onda. Os tubos que apresentaram fluorescência azulada foram considerados positivos para *E.coli*, sendo então calculado o NMP.

Foi realizada a confirmação adicional para a presença de *E.coli* gotejando-se o reativo de Indol segundo Kovacs (solução de paradimetilaminobenzaldeído em álcool isoamílico) nos tubos que apresentaram fluorescência. O desenvolvimento de um anel vermelho-rosado na superfície do tubo indicava reação positiva, pois o triptofano presente na composição do meio é desdobrado pela enzima triptofanase da *E.coli* produzindo indol (Figura 3).

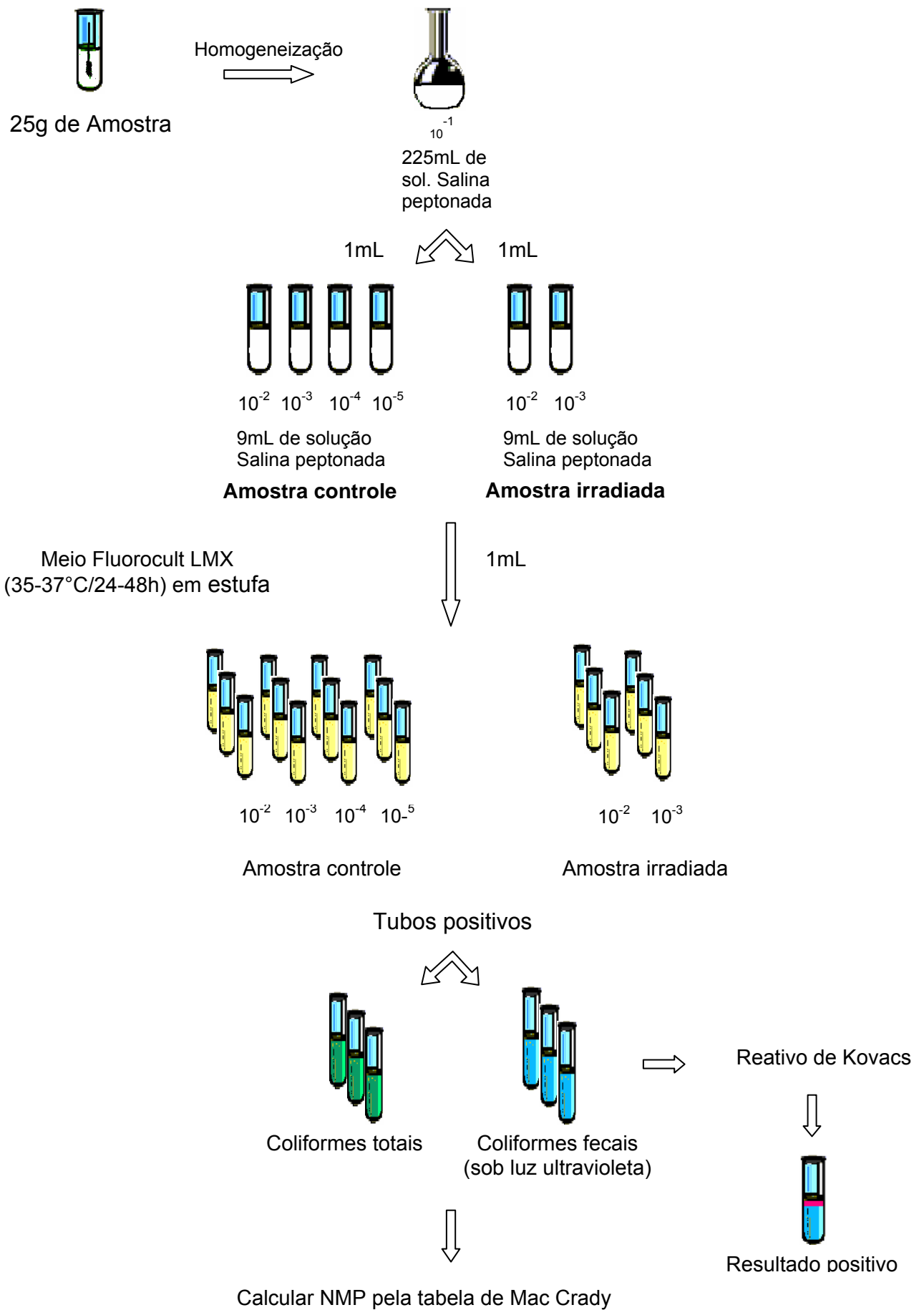


Figura 3: NMP de *Escherichia coli* (KORNACKI e JOHNSON, 2001) – Método I

3.2.4.2 Isolamento e identificação de cepas de *E.coli* patogênicas (EIEC, EPEC, EHEC) (MENG et al. 2001) **Método II**

Após a aplicação das técnicas de assepsia com álcool (70%) na bancada e na superfície da embalagem da amostra, foram pesados 25 gramas da amostra, adicionados em 225ml de BHI Merck nº 10493, (que irá recuperar as condições fisiológicas do germe, estimulando a produção enzimática, e aumentando todo o potencial imunogênico e patogênico) e homogeneizados em “stomacher” em velocidade normal por dois minutos.

O homogeneizado foi incubado à 35°C durante 3 horas. Após incubação, foi semeado todo o inóculo em 250mL de caldo triptona fosfato sendo novamente incubado à 44°C em banho-maria durante 20 horas. Em seguida fez-se a semeadura em placas com ágar Mac Conkey Merck nº 5465(neste meio os sais biliares e o cristal violeta inibem a microbiota Gram negativas, e a lactose junto com o indicador do pH vermelho neutro, são usados para detectar a degradação da lactose, produzindo ácido, formando UFC lactose positivas avermelhadas e em torno uma zona turva devido ao precipitado de ácidos biliares resultante da queda do pH), ágar EMB Merck nº 1347, (neste meio ocorre a fermentação da lactose, produzindo ácido, e inibição das bactérias Gram negativas, pela presença dos corantes em sua formulação, formando UFC de coloração verde com brilho metálico com centro negro azulado), ágar SS OXOID CM099 (neste meio a bile bovina e a elevada concentração de tiosulfato e citrato inibem consideravelmente a microbiota acompanhante, formando assim UFC de coloração rósea a vermelho pela degradação da lactose com produção de ácido) incubando-as invertidas, por 18-24h á 35°C.

Posteriormente foram selecionadas de três à cinco colônias típicas e suspeitas de *E.coli*, e transferidas para o meio SIM Merck nº1.05470 e Agar Citrato de Simmons Merck nº 2501(por não utilizar o citrato como fonte de carbono e nem os sais de amônio com nitrogênio, não determinam a viragem do indicador azul de bromotimol, permanecendo assim a cor esverdeada do meio), com uma incubação a 35-37°C por 24-48h, para verificar se no meio SIM a produção de sulfeto (H₂S), indol, motilidade, sendo separados os cultivos que apresentaram a formação de H₂S, considerando-se suspeitos de serem *E.coli* aqueles que foram H₂S negativo, indol positivo, motilidade positiva ou negativa , e para ágar citrato considerou-se suspeito de *E.coli* aqueles que apresentaram ausência de crescimento. Os isolamentos com

este perfil foram identificados após incubação à 35-37°C por 24-48h, empregando-se os meios de cultura EPM (PROBAC), MILI (PROBAC). No meio EPM foram observadas a produção de ácido e/ou gás a partir da glicose (+), a produção de H₂S(-), l-triptofano desaminase (-) e uréase (-). No MILI observou-se a mobilidade (+/-), produção de indol(+) e l-lisina descarboxilase(+/-). Em seguida os confirmados bioquimicamente como *E.coli*, foram mantidos em geladeira à 4°C para posterior realização da sorologia e antibiograma (Figura 4).

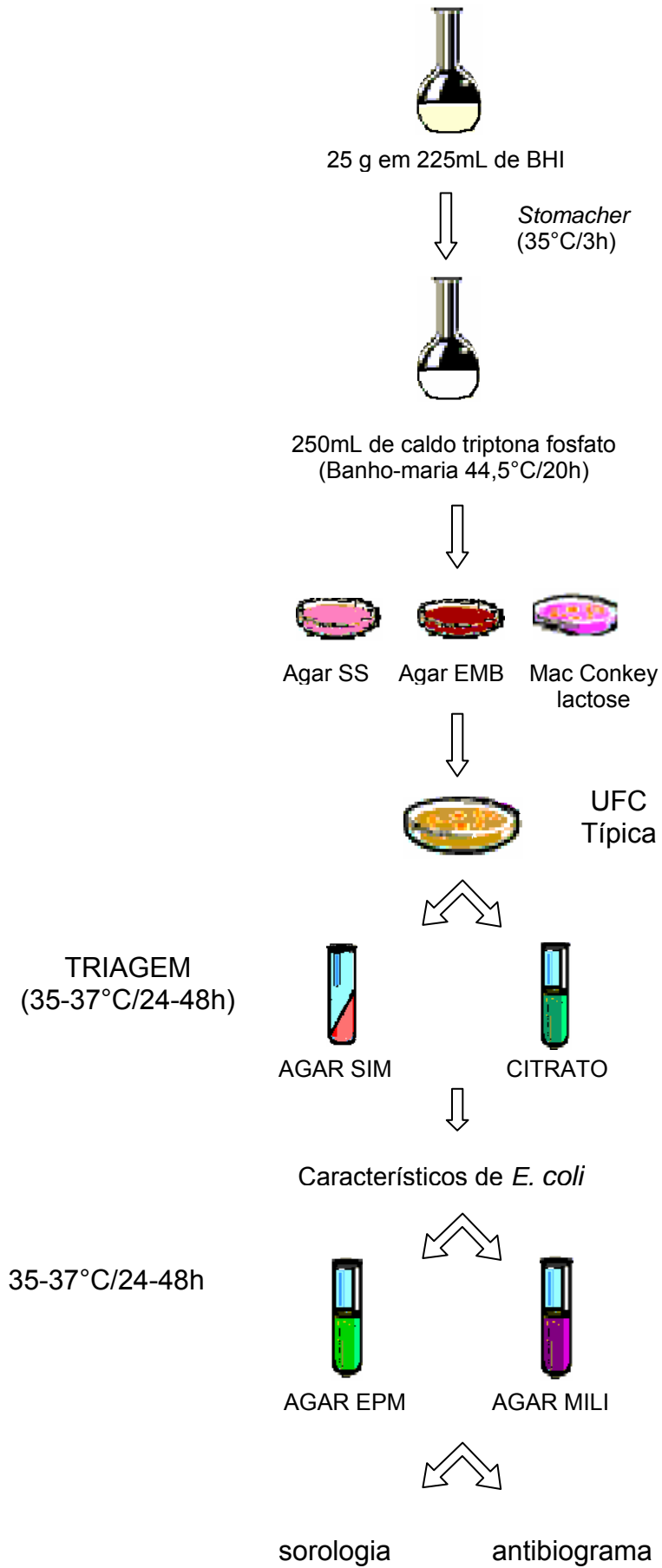


Figura 4: Isolamento e identificação de cepas de *E.coli* patogênicas (EIEC, EPEC, EHEC) (MENG et al. 2001) **Método II**

3.2.4.3 Isolamento e identificação de *E.coli* O157:H7 e diferenciação de cepas enterohemorrágicas (EHEC) (MERCK, 1996) – **Método III**

Após a aplicação das técnicas de assepsia com álcool (70%) na bancada e na superfície da embalagem da amostra, foram pesados 25g da amostra e adicionados 25g de amostra em 225mL de Caldo Lauril Sulfato Merck nº 10266, este meio possui uma elevada qualidade nutritiva, e o fosfato atuando como tampão, garante um rápido crescimento com intensa formação de gás (pela fermentação lenta da lactose), e a seletividade é fornecida pelo Lauril Sulfato de Sódio, sendo homogeneizados em “stomacher” em velocidade normal por dois minutos. O homogeneizado foi incubado em estufa à 35°C durante 24 horas. Em seguida foi feita semeadura em ágar *E.coli* O157:H7 fluorocult Merck nº 1.04036 e ágar Mac Conkey Sorbitol OXOID CM813. Foram semeados 0,1 mL do subcultivo crescido no caldo, na superfície de ágar *E.coli* O157:H7 e em Mac Conkey Sorbitol em placas de modo a obter colônias isoladas, incubando-se as placas por 24h à 35°C. As colônias sorbitol negativas ou positivas foram analisadas mediante uma lâmpada ultravioleta (UV) de comprimento de onda de 366nm, com referência a formação de fluorescência no meio ágar *E.coli* O157:H7 e presença de colônias incolores no meio ágar Mac Conkey sorbitol.

Posteriormente foram selecionadas de três a cinco colônias típicas e suspeitas de *E.coli*, e transferidas para o meio SIM e Ágar Citrato de Simmons, com uma incubação a 35-37°C por 24-48h, para verificar-se no meio SIM a produção de sulfeto (H_2S), indol, motilidade, sendo separados os cultivos que apresentaram a formação de H_2S , considerando-se suspeitos de serem *E. coli* aqueles que foram H_2S negativo, indol positivo, motilidade positiva ou negativa, e para ágar citrato de Simmons considerou-se suspeito de *E.coli* aqueles que apresentaram ausência de crescimento. Os isolamentos com este perfil foram identificados após incubação à 35-37°C por 24-48h, empregando-se os meios de cultura EPM e MILI (PROBAC DO BRASIL, 1998). No meio EPM foram observadas a produção de ácido e/ou gás a partir da glicose(+), a produção de H_2S (-), I - triptofano desaminase(-) e uréase(-). No MILI observou-se a mobilidade(+/-), produção de indol(+) e I-lisina descarboxilase(+/-). Em seguida os confirmados bioquimicamente como *E.coli*, foram mantidos em geladeira à 4°C para posterior realização da sorologia e antibiograma (Figura 5).

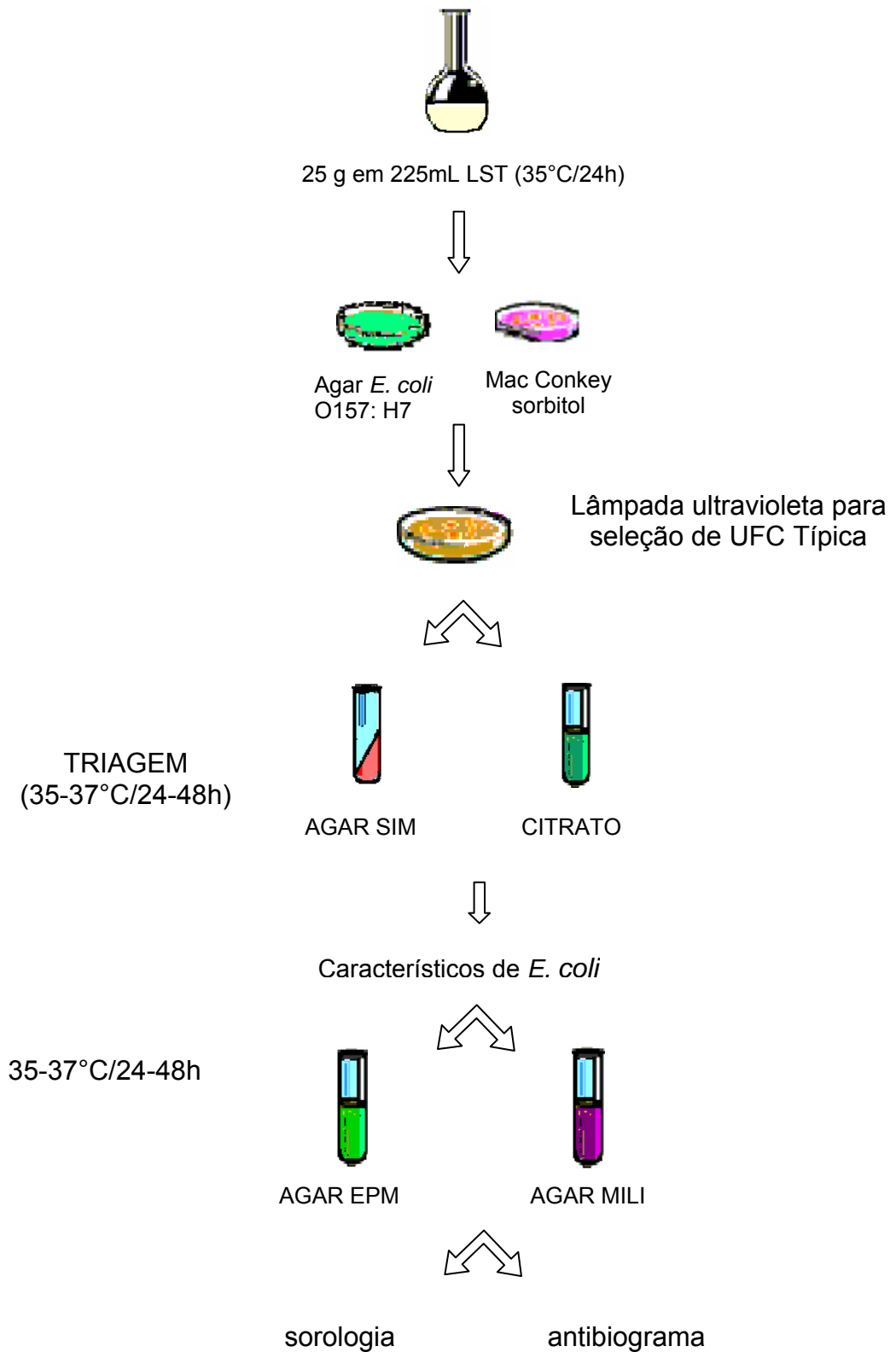


Figura 5: Isolamento e identificação de *E.coli* O157:H7 e diferenciação de cepas enterohemorrágicas (EHEC) (MERCK, 1996) – **Método III**

3.2.4.4 Enumeração, Isolamento e identificação presuntiva de *Enterococcus* (HARTMAN et al. 2001).

Após a aplicação das técnicas de assepsia com álcool (70%) na bancada e na superfície da embalagem da amostra, foram pesados 25g da amostra e adicionados em 225mL de solução salina peptonada a 0,1%, sendo homogeneizados em “stomacher” obtendo-se 10^{-1} . Desta diluição foram retirados 10mL e diluídos em 90mL de solução salina peptonada a 0,1%, obtendo-se a diluição 10^{-2} . Este procedimento foi repetido até obtenção da diluição 10^{-4} para amostras controle e 10^{-3} para as amostras irradiadas. As diluições foram inoculadas em três séries de três tubos contendo o meio “Chromocult Enterococci Broth” Merck nº 10294 no volume de 10mL, na concentração de azida sódica, presente no meio inibe o crescimento da microbiota acompanhante, especialmente de Gram negativas, e o substrato X – GLU (5 -bromo –4- cloro – 3 indol – β – D – glucopyronoside), é degradado pela enzima b-D- glucosidase que é característica do *Enterococcus*, estimulado pela presença de peptonas, isto resulta na coloração azul das colônias, que indica a presença de *Enterococcus* e D - *Streptococcus*, com incubação a 35 – 37°C/ 24 – 48 horas.

Após incubação, considerou-se positivo, os tubos que apresentaram viragem de cor do amarelo para cor verde-azulada forte, indicando a presença de *Enterococcus*. A partir da combinação dos tubos positivos, calculou-se o Número Mais Provável (NMP), com base na tabela de Mac Crady.

Para confirmação dos resultados positivos de cada tubo, em cada uma das fases das análises de *Enterococcus*, foram confeccionadas lâminas para verificar as características morfotintoriais do microrganismo pesquisado (Cocos Gram positivo) pela bacterioscopia em imersão, e a prova bioquímica da bile esculina, que consiste no enegrecimento do meio, sendo decorrente da reação entre a esculetina, que é formada pela hidrólise da esculina, e o ferro, presente no meio e a partir desta confirmação, foram estocados em caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) com 10% de glicerol, mantidos em geladeira à 4°C, para a realização do antibiograma (Figura 6).

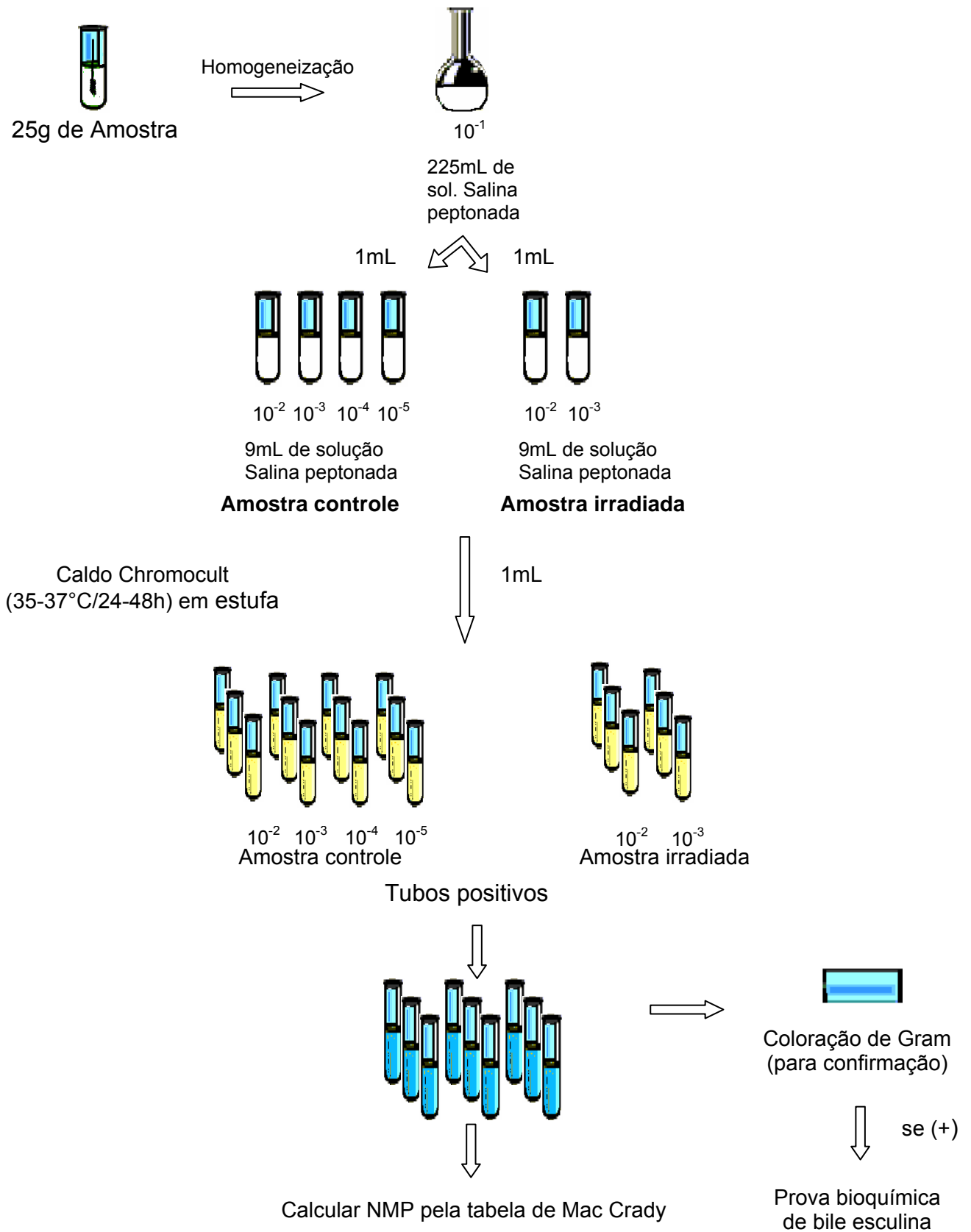


Figura 6: Enumeração, Isolamento e identificação de *Enterococcus* (HARTMAN et al. 2001).

3.2.5 SOROLOGIA PARA *E. COLI*

Todas as colônias de *Escherichia coli* foram sorotipadas para a investigação daquelas pertencentes ao grupo das *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC) e *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC - O157).

Os soros polivalentes de EPEC contêm anticorpos contra os seguintes sorogrupos: Poli A - O26, O55, O11 e O119; Poli B - O114, O125, O142 e O158 e Poli C - O86, O126, O127 e O128.

Os soros polivalentes para EIEC contêm anticorpos contra os seguintes sorogrupos: Poli A: O28ac, O29, O136, O144 e O152; e Poli B - O112ac, O124, O143, O164 e O167.

Soro anti *Escherichia coli* O157 (EHEC).

Foram utilizados antisoros polivalentes da Probac do Brasil LTDA.

Todas as colônias positivas na soroaglutinação com os anti-soros polivalentes foram testados com os anti-soros monovalentes correspondentes. Para a soroaglutinação em placa com anti-soros poli e monovalentes seguiu-se a metodologia descrita por Ewing (1986). O antígeno utilizado para o teste foi a suspensão bacteriana obtida com cerca de 0,3 mL de solução salina esterilizada adicionada a uma cultura bacteriana de 18-24 horas à 35°C em ágar Caso ("Tryptic soy" agar) (Merck nº 1.05458) inclinado, tendo-se o cuidado de testar, anteriormente, se o soro era aglutinante, utilizando-se uma gota de soro e uma gota de solução salina, para verificar a não ocorrência de aglutinação (controle).

3.2.6 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Todas as cepas de *Escherichia coli* patogênicas sorogrupos EPEC - A O111, O119 e O26; EPEC - B O125 e O142; e EIEC - O136 e para os 64 cultivos positivos de *Enterococcus*, foram escolhidos 15 tubos, a partir da confirmação da prova bioquímica da bile esculina foram testados frente a antimicrobianos, cujo método utilizado foi o da NCCLS (1992), baseando-se no método originalmente descrito por (Bauer et al.1966) com o preparo de inóculo para a leitura de 18horas com uso de polisensidisc 4X6. O meio base utilizado foi o Ágar Müeller Hinton (Merck nº 05437).

As cepas isoladas, biotipificadas e sorotipadas, em estoque, foram mantidas em meio ambiente durante 30 minutos, sendo após esse tempo semeadas em Ágar Caso (Merck nº 1.05458) e incubadas à 37°C por 18-24 horas. A partir dos subcultivos crescidos foram emulsionadas em 4mL de água destilada esterilizada, padronizando-se a suspensão para a turvação igual ao padrão nº 1 da escala de Mac Farland: 1mL de cloreto de bário a 1% com 99mL de ácido sulfúrico a 1% (0,36N) que corresponde a $3,8 \times 10^8$ microrganismos por mililitro. As placas contendo Ágar Müeller Hinton, após serem retiradas da geladeira, incubadas à 37°C durante uma hora antes da semeadura e mantidas em temperatura ambiente por três a cinco horas, foram semeadas utilizando-se “swab” esterilizado embebido no inóculo, sendo espalhado homoganeamente na superfície do meio. Após a absorção do inóculo por alguns minutos, foram colocados os” polisensidisc 4x6”, utilizando-se uma pinça previamente flambada e resfriada; sendo em seguida as placas incubadas à 37°C durante 18-24 horas. A leitura dos resultados da sensibilidade aos antimicrobianos, foi realizada medindo-se o tamanho das zonas de inibição de crescimento bacteriano com um halômetro, sendo a cepa bacteriana classificada em resistente, intermediário, moderadamente sensível ou sensível em função do diâmetro da zona de sensibilidade padrão estabelecida para cada antimicrobiano (Figura7).



Figura 7: Visualização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos

3.2.7 ANÁLISE SENSORIAL

As amostras foram separadas em unidades por dose de radiação, e por estarem congeladas foram submetidas ao descongelamento em “overnight”. Após o descongelamento foram cozidas em salmoura a 1%, durante um minuto, em fogão convencional em fogo máximo e depois separadas, de acordo com o sexo do mexilhão, em bandejas identificadas (figura 8).



Figura 8: Identificação das amostras para análise sensorial.

Cada amostra teve um número aleatório de três dígitos para identificação após a análise. Os mexilhões foram servidos em pratos descartáveis codificados acompanhados de um copo descartável com água filtrada para o enxágüe da boca entre as degustações (figura 9).



Figura 9: Utensílios e amostras usadas na análise sensorial.

Os julgadores foram 30 estudantes e funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, de faixa etária variável entre 21 e 54 anos.

Foi realizado o teste de aceitação em escala hedônica verbal estruturada, variando entre os termos gostei muitíssimo e desgostei muitíssimo para sabor, aroma, textura e aceitação global da carne de mexilhão (CHAVES, 1993).

A partir dos escores de aceitação quanto ao aroma em mexilhões irradiados e não irradiados de ambos os sexos procedeu -se a análise de variância pelo Teste F em delineamento em bloco casualizado.

A partir dos escores de aceitação quanto ao sabor, textura e impressão global, em mexilhões irradiados e não irradiados de sexos distintos, procedeu-se a análise de variância (Teste F) no experimento fatorial 4^2 (4 tratamentos e 2 sexos) em delineamento inteiramente casualizado.

Todas as análises foram procedidas no programa estatístico SAS (SAS, 1999).

4 RESULTADOS

Os resultados seguirão a mesma seqüência da metodologia efetuada nesta pesquisa.

4.1 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

4.1.1 NMP DE *ESCHERICHIA COLI* (KORNACKI e JOHNSON, 2001) **MÉTODO I** E NMP DE *ENTEROCOCCUS* E IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA (HARTMAN et al. 2001).

Tabela 1 - Valores médios dos NMP de *Escherichia coli* e *Enterococcus* em mexilhões não irradiados (testemunha) e irradiados com doses de 3, 5 e 7 kGy.

microrganismo	N	Testemunha	3kGy	5kGy	7kGy
<i>E. coli</i>	10	$x^a = 0,35$	$x^b = 0,06$	$x^b = 0,04$	$x^b = 0$
<i>Enterococcus</i>	10	$x^a = 2,08$	$x^b = 0,02$	$x^b = 0,08$	$x^b = 0$

* Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não diferenciam entre si ao nível de 5% de significância

A tabela 1 fornece o NMP de *Escherichia coli* e de *Enterococcus*, com base na tabela de Mac Crady.

Para análise estatística, foi utilizado o teste de média de Tukey, tanto a ANOVA como o teste de Tukey foram realizados ao nível de 5% de significância.

Os resultados indicaram para *E.coli* que a amostra 1 diferiu significativamente ($p < 0,05$) das amostras 2, 3 e 4, as quais não diferiram entre si ($p > 0,05$) e para *Enterococcus* o resultado foi idêntico ao de coliformes.

Dos 64 cultivos suspeitos de *Enterococcus*, foram selecionados 16 isolados, sendo 11 originários de amostras não irradiadas (controle), três com dose de 3kGy e duas com dose de 5kGy.

A partir destes cultivos, foram confeccionadas lâminas para verificar as características morfotintoriais do microrganismo pesquisado (Cocos Gram positivo) pela bacterioscopia em imersão, e a prova bioquímica da bile esculina (Figura 10), onde ocorreu o enegrecimento do meio decorrente da reação entre esculitina, que é formada pela hidrólise da esculina, e o ferro presente no meio, nesta prova bioquímica, todos os cultivos de *Enterococcus* tiveram resultado positivo.

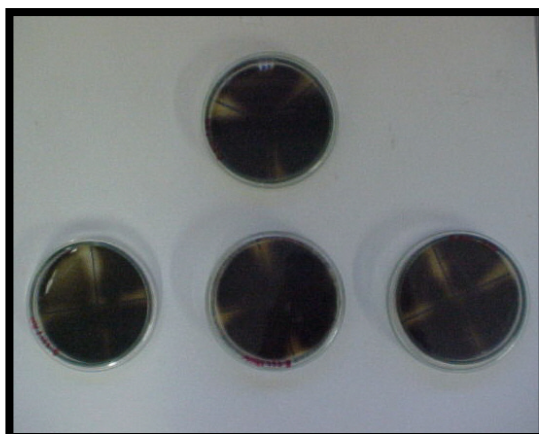


Figura 10: Placas indicando prova positiva para hidrólise da esculina.

Não foi encontrado cultivo suspeito de *Enterococcus* e de *E.coli* em nenhuma das irradiadas com dose de 7kGy.

4.1.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS DE *E. COLI* PATOGÊNICAS (EIEC, EPEC, EHEC) (MENG et al. 2001) **MÉTODO II**

Tabela 2 - Isolamento e identificação de cepas de *E. coli* patogênicas (EIEC, EPEC, EHEC).

Amostras	EPEC A	EPEC B	EIEC A	total
Não irradiadas	O111 (4)	O125 (5)	O136 (1)	10
	O119 (4)	O142 (4)		8
	O26 (2)			2
Irradiadas 3 kGy	O111 (1)			1
Irradiadas 5 kGy	O111 (2)			2
Total	13	9	1	23

Considerando-se os dados da tabela acima, observa-se que das 137 colônias suspeitas e confirmadas em testes bioquímicos, 23 (31,5%), foram positivas para os sorogrupos EPEC e EIEC.

Para o grupo das amostras controle, 19 amostras estavam contaminadas por EPEC (quatro (9,2%) cepas A O111, quatro (9,2%) cepas A O119, duas (4,5%) A O26, cinco (11,5%) cepas B O125, quatro (9,2%) cepas B O142) e para EIEC uma (2,3%) cepa A O136.

Para amostras irradiadas com doses de 3 e 5 kGy, foram encontradas amostras contaminadas respectivamente por EPEC (Uma(2,3%) cepa A O111 e duas(4,5%) cepas A O111).

4.1.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *E. COLI* O157:H7 E DIFERENCIAÇÃO DE CEPAS ENTEROHEMORRÁGICAS (EHEC) (MERCK, 1996) – **MÉTODO III**

Não foi encontrada nenhuma cepa positiva para o sorogrupo EHEC (*Escherichia coli* enterohemorrágica).

4.2 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.

Tabela 3 - Comportamento de 23 cepas de *Escherichia coli* isoladas e sorotipadas como patogênicas frente aos antimicrobianos, provenientes de amostras de mexilhão não irradiado (testemunha) e irradiado à 3kGy, 5kGy e 7kGy.

Antimicrobiano	N (%) de cepas testemunho (20)				N (%) de cepas irradiadas 3kGy (01)				N (%) de cepas irradiadas 5kGy (02)			
	R	I	MS	S	R	I	MS	S	R	I	MS	S
Cloranfenicol (CLO)	11 (55)	01 (5)	0	08 (40)	01 (100)	0	0	0	02 (100)	0	0	0
Aztreonam (ATM)	14 (70)	0	01 (5)	05 (25)	01 (100)	0	0	0	02 (100)	0	0	0
Sulfazotrim (SUT)	12 (60)	03 (15)	0	05 (25)	01 (100)	0	0	0	02 (100)	0	0	0
Ceftadizima (CAZ)	13 (65)	01 (5)	0	06 (30)	01 (100)	0	0	0	02 (100)	0	0	0
Cefotaxima (CTX)	13 (65)	0	0	07 (35)	0	0	01 100	0	02 (100)	0	0	0
Amicacina (AMI)	15 (75)	01 (5)	0	04 (20)	01 (100)	0	0	0	02 (100)	0	0	0
Netilmicina (NET)	08 (40)	02 (10)	01 (5)	09 (45)	01 (100)	0	0	0	02 (100)	0	0	0
Ampicilina (AMP)	15 (75)	01 (5)	02 (10)	02 (10)	01 (100)	0	0	0	02 (100)	0	0	0
Cefalotina (CFL)	17 (85)	01 (5)	0	02 (10)	01 (100)	0	0	0	02 (100)	0	0	0
Cefoxitina (CFO)	11 (55)	01 (5)	02 (10)	06 (30)	01 (100)	0	0	0	02 (100)	0	0	0
Gentamicina (GEN)	14 (70)	0	0	06 (30)	01 (100)	0	0	0	02 (100)	0	0	0
Tetraciclina (TET)	11 (55)	01 (5)	0	08 (40)	01 (100)	0	0	0	02 (100)	0	0	0

R= resistente, I= intermediária, MS= moderadamente sensível, S= sensível

O resultado do teste de sensibilidade aos antimicrobianos para *Escherichia coli* pode ser visualizado no quadro acima, onde se observa que para as 20 cepas de amostras testemunhas, a resistência variou entre 40% a 85%, intermediário de 5% a 10%, moderadamente sensível de 5% a 10% e para sensível de 10% a 45%.

Para a cepa de amostra irradiada com dose de 3kGy, foi 100% resistente a 11 antimicrobianos testados e moderadamente sensível para apenas um antimicrobiano (NET).

As duas cepas de amostras irradiadas com dose de 5kGy, testadas frente aos antimicrobianos, foram 100% resistentes.

Tabela 4 - Comportamento de 15 cepas de *Enterococcus* spp. isoladas, frente aos antimicrobianos provenientes de amostras de mexilhão não irradiado (testemunha) e irradiado à 3kGy, 5kGy e 7kGy.

Antimicrobiano	N (%) de cepas testemunho (10)				N (%) de cepas irradiadas 3kGy (03)				N (%) de cepas irradiadas 5kGy (02)			
	R	I	MS	S	R	I	MS	S	R	I	MS	S
Penicilina (PEN)	10 (100)	0	0	0	03 (100)	0	0	0	01 (50)	0	01 (50)	0
Oxacilina (OXA)	08 (80)	01 (10)	0	01 (10)	03 (100)	0	0	0	02 (100)	0	0	0
Teicoplamina (TEC)	05 (50)	02 (20)	0	03 (30)	0	01 (33)	0	02 (66)	0	01 (50)	0	01 (50)
Vancomicina (VAN)	03 (30)	01 (10)	0	06 (60)	0	0	0	03 (100)	01 (50)	01 (50)	0	0
Eritromicina (ERI)	10 (100)	0	0	0	03 (100)	0	0	0	01 (50)	0	0	01 (50)
Clindamicina (CLI)	10 (100)	0	0	0	03 (100)	0	0	0	02 (100)	0	0	0
Netilmicina (NET)	05 (50)	01 (10)	0	04 (40)	01 (33)	01 (33)	0	01 (33)	0	01 (50)	0	01 (50)
Ampicilina (AMP)	05 (50)	01 (10)	0	04 (40)	02 (66)	0	0	01 (33)	02 (100)	0	0	0
Cefalotina (CFL)	07 (70)	0	0	03 (30)	02 (66)	0	0	01 (33)	01 (50)	01 (50)	0	0
Cefoxitina (CFO)	10 (100)	0	0	0	03 (100)	0	0	0	01 (50)	0	01 (50)	0
Gentamicina (GEN)	08 (80)	0	0	02 (20)	02 (66)	0	0	01 (33)	01 (50)	01 (50)	0	0
Tetraciclina (TET)	08 (80)	01 (10)	0	01 (10)	02 (66)	0	0	01 (33)	01 (50)	0	0	01 (50)

R= resistente, I= intermediária, MS= moderadamente sensível, S= sensível

O resultado do teste de sensibilidade para os *Enterococcus* pode ser visualizado no quadro acima, onde se observa que das cepas de *Enterococcus* spp.

do grupo testemunha isoladas, foram 100% resistentes a apenas quatro antimicrobianos (PEN, ERI, CLI e CFO), enquanto que para os demais antimicrobianos a resposta do teste foi variável.

Para cepas de amostras irradiadas com dose de 3kGy, foram 100% resistentes a cinco antimicrobianos (PEN, OXA, ERI, CLI e CFO), e 100% sensível a apenas um antibiótico (VAN).

Para cepas de amostras irradiadas com dose de 5 kGy foram 100% resistentes a apenas três antimicrobianos (OXA, CLI, AMP), 50% intermediário a apenas cinco antimicrobianos (TEC, VAN, NET, CFL, GEN), 50% moderadamente sensível a apenas dois antimicrobianos (PEN e CFO), e 50% sensíveis a apenas quatro antimicrobianos (TEC, ERI, NET e TET).

4.3 ANÁLISE SENSORIAL

Não foi observado efeito de tratamento sob a aceitação sensorial quanto ao aroma em mexilhões de ambos os sexos.

Não ocorreu diferença significativa ($p > 0,05$) nos escores de aceitação quanto ao sabor, textura e impressão global em mexilhões machos e fêmeas irradiados e não irradiados.

Da mesma forma, o sexo não interferiu significativamente ($p > 0,05$) na aceitação sensorial das amostras testadas.

5 DISCUSSÃO

Considerando-se que os mexilhões são moluscos filtradores e que podem manter a microbiota de contaminação fecal (coliformes fecais) no interior do seu trato intestinal, corrobora os dados encontrados nesta pesquisa, nas amostras controle quando comparado com os dados encontrados por Casas e Hipólito (1993) que também encontraram presença de coliformes fecais pesquisados em berbigão, porém os seus resultados foram mais significativos por terem analisado amostras “in natura” da espécie em estudo.

Apesar da irradiação ser bastante estudada neste tipo de alimento, ainda não existe uma dose ideal para destruição total de microrganismos patogênicos, fato constatado neste estudo, onde foram utilizadas doses de 3, 5 e 7kGy, entretanto nas amostras irradiadas com doses de 3 e 5kGy, respectivamente, foi observada presença de coliformes fecais e de *Enterococcus* e ausência total nas amostras irradiadas com dose de 7kGy.

Jay (1991), constatou que os coliformes são mais fáceis de serem isolados e identificados que os *Enterococcus*, embora estes sejam mais resistentes às condições ambientais adversas, contudo no presente trabalho, analisando-se estatisticamente, não houve diferença significativa entre os microrganismos em questão.

DICKSON (1995) considera que a grande maioria das bactérias de interesse para Saúde Pública são relativamente sensíveis a irradiação e que, doses de 1,5 a 3,0 kGy são suficientes para reduzir os níveis destas bactérias, fato constatado neste estudo onde foi utilizado doses de 3, 5 e 7kGy, WHO, 1994, cita que a redução bacteriana em pesquisas com camarões irradiados com doses entre 1 e 3

kGy também determinaram redução da carga microbiana, corroborando os dados desta pesquisa.

Embora se saiba que a radicação quando empregada para destruição de bactérias, deva ser usada na faixa de 2 a 8 kGy, conforme estabelece Diehl, 1990, pois na pesquisa ora desenvolvida, a dose mínima (3kGy) aplicada foi suficiente para determinar a eficácia do processo, cujos resultados sugerem não haver necessidade da aplicação de doses maiores (5 e 7 kGy), pois não ocorreu diferença significativa ($p > 0,05$) entre estas doses, seja nos resultados bacteriológicos encontrados ou nos resultados da análise sensorial.

Siqueira (2001), ao estudar a redução de coliformes fecais (*E.coli*) em amostras de tilápia irradiadas com dose de 2,2 kGy, também encontrou redução desta microbiota, entretanto, convém ressaltar que a espécie de amostra trabalhada com menor dose de radiação aplicada, possa ter sido importante na diferença dos resultados encontrados. Essa autora também considera que a efetividade encontrada em sua pesquisa foi pequena, contudo, WHO (1990), afirma que as bactérias Gram negativas são mais sensíveis à radiação do que as bactérias Gram positivas, ora assertiva é confirmada nos resultados como consta na tabela 1. No entanto Olson (1998), relata que estudos com doses na faixa de 1-5 kGy, houve sobrevivência de bactérias GRAM positivas induzindo a deterioração do alimento irradiado após prolongado período de estoque em refrigeração.

Harewood et al. (1994), ao desenvolverem pesquisa objetivando estudar os efeitos da redução sobre o prazo de vida comercial e redução da carga microbiana em mexilhões aplicando dose de 5kGy, confirma a conclusão ora descrita ao afirmar que essa faixa de dose é eficaz na redução da microbiota presente.

Germano e Germano (2001), recomendam a utilização de doses de radiações ionizantes (raios gama), na faixa de 1 a 7 kGy para amostras de mariscos com o objetivo de reduzir a carga bacteriana, esta recomendação pode ser confirmada na metodologia analítica aplicada neste experimento.

Valente (2002) afirma que a dose de 2kGy aplicada em mexilhões congelados é capaz de reduzir a microbiota mesófila e psicrotrófica nestas amostras. Apesar da utilização de doses de 3, 5 e 7 kGy, aplicadas nesta pesquisa com o mesmo tipo de

amostra, houve redução de *E.coli* e *Enterococcus* , e estas apesar de serem mesófilas, podem ser enquadradas como bactérias psicrotróficas, por se apresentarem viáveis em temperatura de refrigeração, pois atualmente considera-se como psicrotróficos, os microrganismos que são capazes de se desenvolver em temperaturas de refrigeração independente da sua temperatura ótima de desenvolvimento.

Marins (2003), observou em sua pesquisa realizada com amostras de carne de rã testemunha e irradiada com doses de 2, 5 e 7 kGy, médias de NMP de Coliformes fecais, respectivamente de 1,28 log NMP/g, 1,11log NMP/g, 0,92 log NMP/g e 0,36 log NMP/g, tais resultados ao serem comparados com os desta pesquisa, onde foram analisadas amostras de mexilhão testemunha e irradiada com doses de 3, 5 e 7 kGy, respectivamente, e encontradas médias de NMP de coliformes fecais de 0,35 log NMP/g, 0,06 log NMP/g, 0,47 log NMP/g e 0,0 log NMP/g, demonstrando, em função dos resultados, que nesta pesquisa, a irradiação foi mais eficaz na redução da microbiota.

De acordo com a Legislação Nacional, RDC nº 12 de 02 de Janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), o limite de tolerância de coliformes a 45° C ou temotolerantes é de 5×10^4 para moluscos cozidos, refrigerados ou congelados, tendo em vista, o resultado encontrado nesta pesquisa que foi de 0,35/g de amostra, observam-se valores dentro do limite aceitável por esta Resolução. Com relação ao *Enterococcus*, não existe padrão microbiológico, entretanto, no ANEXO II desta mesma legislação, fica mencionado que: "PRODUTO ou LOTE (se a amostra indicativa ou representativa, respectivamente) IMPRÓPRIO PARA CONSUMO HUMANO POR APRESENTAR... (microrganismo patogênico ou toxina que representa perigo à saúde do consumidor)", concluindo-se que nas amostras em que foram detectadas *Enterococcus* spp. estavam impróprios para consumo.

Os padrões de identidade e qualidade nacionais vigentes com referência a irradiação de alimentos, BRASIL (2001), recomenda que a dose mínima de radiação no alimento deve alcançar a finalidade pretendida e não comprometer as propriedades funcionais e/ou atributos sensoriais do alimento, que pode ser comprovado neste trabalho, onde se avaliou o efeito da irradiação, com doses de 3,

5 e 7kGy. Constatou-se que com a dose mínima utilizada, obteve-se o mesmo resultado na redução da carga bacteriana das outras doses utilizadas.

Montelli e Sadatsune (2001), demonstraram que 95% dos patógenos isolados em experimentos laboratoriais são sensíveis ou resistentes aos antimicrobianos testados. Nos experimentos laboratoriais, ora desenvolvidos, as cepas de *Enterococcus* variaram a resistência entre 30% a 100%, e sensibilidade entre 10% a 60%, aos antimicrobianos usados em tratamento infecciosos em humanos, quer seja para as cepas de amostras testemunha e para cepas de amostras irradiadas com 3 kGy que variou a resistência entre 33% a 100% e sensibilidade entre 33% a 100%, e com 5 kGy a resistência variou entre 50% a 100% e sensibilidade todas foram 50%. Entretanto, para ação antimicrobiana de *E. coli* foram encontrados percentuais entre 40% a 85% resistentes e 10% a 45% sensíveis. Nas amostras irradiadas com dose de 3 e 5 kGy, apresentaram 100% de resistência a 11 antimicrobianos e 100% de resistência aos 12 antimicrobianos que compõem o disco de sensibilidade, respectivamente.

Cereda (2002), adverte que a taxa de *Enterococcus* resistente à vancomicina com esta característica é de 3,7%, entretanto, nesta pesquisa, para as cepas de amostras testemunha o resultado foi de 30% à vancomicina, não havendo resistência de cepas de amostras com dose de 3 kGy para este antimicrobiano, contudo para cepas de 5 kGy, houve resistência de 50%.

Os dados científicos relatados por Wong et al. (1988); Guillot et al.(1977), com referência ao surgimento da resistência antimicrobiana pelas bactérias, a sua possível transferência às gerações subsequentes aos alimentos, foram observados nos resultados aqui descritos quer sejam para amostras controle e amostras irradiadas.

Um dos tipos básicos de teste sensorial, utilizado rotineiramente, é classificado por Stone e Siedel (1995) como sendo afetivo, e as características pertinentes a esta classificação foram exclusivas e essenciais para a análise sensorial desta pesquisa.

Yueh – Jen et al. (1983), demonstraram que amostras de peixes irradiados com dose de 3,0 kGy, apresentaram mudança sensorial perceptível, entretanto,

neste experimento não ocorreu este tipo de alteração sensorial que corrobora estatisticamente por não haver diferença significativa ($p > 0,05$).

Hau et al. (1992), mencionam que camarões congelados e irradiados com dose de 4,5 kGy apresentaram alteração de sabor, no entanto, o pescado estudado neste trabalho, permaneceu com aroma e sabor “sui generis”.

Segundo Beirão et al. (2002), as características sensoriais de mexilhões machos e fêmeas, analisados separadamente, através de uma escala hedônica, e tendo como variável o gosto, encontrou-se diferença significativa, fato este não encontrado nesta pesquisa, onde o resultado apresentado em relação ao gosto não ocorreu diferença significativa.

6 CONCLUSÕES

- A irradiação foi eficaz sobre a microbiota estudada, porém, mais efetiva sobre *Escherichia coli* do que nos *Enterococcus*.
- A dose mínima (3 kGy) utilizada nesta pesquisa foi suficiente na redução da carga bacteriana quer seja para *E.coli* quer para *Enterococcus*.
- O consumo de carne de mexilhão pode tornar-se risco em potencial ao consumidor quanto à resistência a antimicrobianos seja em amostras irradiadas ou não, por ter sido isoladas cepas de *E.coli* e *Enterococcus* resistentes a inúmeros antimicrobianos.
- Todas as amostras de mexilhões encontravam-se dentro dos limites aceitáveis pela resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 para *E. coli*. As amostras cujos resultados apresentaram *Enterococcus* devem ter seu consumo avaliado com restrições, pois estes organismos podem causar ETA aos ingestores, muito embora, a resolução acima mencionada não estabeleça padrões para o mesmo.
- O processo de irradiação não alterou as características sensoriais da carne de mexilhão permanecendo com aroma e sabor “sui generis”, quer seja em amostras irradiadas ou não irradiadas quer seja para espécimes machos e fêmeas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA REPORTS - AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. Position of the American Dietetic Association. USA, v. 96, n.1, p. 69-72. Janeiro, 1996.

BALDINI, M. D., CUBBITO, M. A., CHIARELLO, C. B., CABEZALI, C. B. Water quality for aquaculture development in Bahia Blanca estuary, Argentina. Bacteriological studies. *Revista Argentina de Microbiologia*, n.31, p. 19-24, 1999.

BATISTA, C.R. V.; MEINRET, E. M. Incidência de *Salmonella* sp. Em sardinhas (*Sardinella brasiliensis*, Steindachner, 1798) refrigerada. In: Encontro nacional de Analistas de Alimentos. I Simpósio Brasileiro de Química de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. 2-6 Out., João Pessoa- PB. 1995.

BAUER, A, KIRB, W. M., SHERRIS, J. C. e cols. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Path.* 36: 493-496, 1966.

BEIRÃO, L. H., et al. Bioecologia de produtos marinhos. Disponível: www.setorpesqueiro.com.br/tecnologiadealimentos/moluscos/aspectos sensoriais.sht [capturado em 05 de dezembro de 2002]

BLACK, R.E., et al. Incidence and etiology of infantile diarrhea and major routes of transmission in Huscar, Peru. *Am. J. Epidemiol.*, v. 129, p.785-799, 1989.

BLACK, R.E. Epidemiology of traveler's diarrhea and relative importance of various pathogens. *Rev. Infect. Dis.*, v. 12, S73-S79, 1990.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 20, de 18 de junho de 1986. Estabelece a classificação das águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, DF, 30 JUL. 1986.

———. Ministério da Agricultura. Preservação de alimentos pela radiação ionizante. [s.n], Brasília, p.81, 1968.

———. Decreto nº 72.718 de 29 de agosto de 1973. Estabelece normas gerais sobre irradiação de alimentos. Diário Oficial, 30/08/1973.

———. Ministério da Saúde. Portaria nº 09 – DINAL/MS de 08 de março de

1985. Aprova as normas gerais para a Irradiação de Alimentos e aprova a relação de alimentos cuja irradiação é autorizada. Diário Oficial, 13/03/1985.

———. Ministério da Saúde. Portaria n° 30 – DINAL/MS de 25 de setembro de 1989. Estabelece os alimentos especificados a autorização de uso de tratamento por irradiação. Diário Oficial, 28/09/1989.

———. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n° 21 de 26 de janeiro de 2001a. Regulamento Técnico para a Irradiação de Alimentos. Diário Oficial, 29/01/2001.

———. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n° 12, de 02 de Janeiro de 2001b. Aprova o Regulamento sobre padrões microbiológicos para alimentos e seus Anexos I e II. Diário Oficial, de 12/01/01.

BUSSANI, M. *Guia Prático del cultivo del mejillon*. Zaragoza: Acribia, 1990. 252 p.

CAMPOS, L. C.; TRABULSI, L. R. *Escherichia*. In: TRABULSI, L.R. ALTERTHUM, F.; GOMPertz, O.F.; CANDEIAS, J. A N. *Microbiologia*. 3 ed. Rio de Janeiro:Ed. Atheneu, 1999, p.87-148, 215-228.

CARNEIRO, M.R.P., VIANA, C.M. Avaliação da qualidade bacteriológica em moluscos bivalves marinhos de grande consumo em Aracajú. In: resumos V Congresso Latino – Americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos. Águas de Lindóia, 1998. p.84.

CASAS, M.G. e HIPÓLITO, M. Análise bacteriológica quantitativa em moluscos bivalves. *Higiene Alimentar*, São Paulo: v. 7, n. 28, p. 40-45, 1993.

CHAVES, J.B.P., 1993, *Métodos de diferença e a avaliação sensorial de alimentos e bebidas*, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

CENTRO DE DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA NUCLEAR (CDTN). O que é a Irradiação. In: *Revista Brasil Nuclear*, n. 19, 1999.

CEREDA R.F. *Avaliação do perfil de sensibilidade e caracterização molecular de Enterococcus spp. isoladas em hospitais da América Latina*. São Paulo, 2000. [tese de doutorado – Universidade Federal de São Paulo/ Escola Paulista de Medicina], São Paulo, 2000.

CHUNG, K. S., ACUÑA, A. Upper temperature tolerance limit of mussel *Perna perna*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fis*, v. 3 n. 47, p.441, 1981.

CNEN – COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR. *Irradiação de alimentos*. CDTN. NEWS. Ano 1, n°0, fev.1996. Disponível na internet via <http://urano.cdtm.br>. Arquivo consultado em 2003.

COOKE, E.M. *Escherichia coli* – na overview. *Journal of Hygiene*, New York, v.95, p.523-530, 1985.

CORDEIRO, C. C. *Manual básico de cultivo e processamento de mexilhões*, agosto, 1998, p.28-29.

CORREIA, W. M., CORRÊA, C. N. M. : *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*, 2ª ed. MEDSI - RJ, 1992, P.175.

DI DIACOMO, R. F. KOEPEL, T. D. Sampling for detection of infection or disease in populations. *Journal American Veterinary Medical Association*, v.189, p.22-23, 1986.

DIAS, J. F. B. *Redução da carga bacteriana da ostra de mangue (Crassostrea rhizophorae) in natura, resfriada e congelada, através da radiação gama*. Niterói, 2002, 95f. Monografia (Especialização em Irradiação de Alimentos) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2002.

DICKSON, J. S. Radurization the pasteurization of foods by ionizing radiation. *J. Food Prot.*, Ames, p.1-7, 1995.

DIEHL, J. F., Safety of irradiated food. New York, Marcel Dekker, p. 345, 1990.

DRASAR, B. S. ; HILL, M. J. The distribution of bacterial flora in the intestine. In: DRASAR, B. S. ; HILL, M.J. (ed). *Human intestinal flora*. Academic Press, London. 1974. p. 36-43.

EPAGRI. EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE SANTA CATARINA S.A *Manual do cultivo do mexilhão Perna perna*. 1994.140p.

ESPANHA. Ministério da Indústria; Ministério de Comércio; Ministério da Agricultura. *Conservacion de alimentos por irradiación*. Madrid, Sericio de Publicacions Del Ministério de Industria, 1967.

EWING, W. H. Edward; Ewing's Identification of *Enterobacteriaceae*. 4 ed. Elsevier Science Publishers; New York, p.93-134, 1986.

FAULHABER, C. A. A importância de um sistema de inspeção e controle de qualidade dos produtos da pesca. In: SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO, 1988, Santos. **Anais...** Santos: Leopoldianum, 1988. p.25-27.

FERREIRA, J. F. Pontos críticos de controle na indústria de moluscos (PCCIM). In: SEMINÁRIO SOBRE ANÁLISES DE RISCOS E PONTOS CRÍTICOS DE CONTROLE (ARCO) NA INDÚSTRIA DE PESCADO, 1995, Campinas. **Anais ...**Campinas : 1995. p.73-82.

FERREIRA, S. R. S., *Contribuição da Tecnologia de Irradiação de Alimentos no Fornecimento de Segurança Alimentar e Nutricional*. Rio de Janeiro, 1999. Tese de M. Sc. Instituto de Nutrição da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

FAO_ *Hygiène der Poisson et dès fruits de mer*. Rapport d'un Comité d'experts de l'OMS réuni en coopération avec la FAO. Organisations des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Genève:,FAO/OMS, 1974. 66p.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION - ORGANIZATION DE LAS NACIONES UNIDAS PARA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION. *Bases técnicas para la legislación referente a los alimentos irradiados*. (informe de un Comité mixto FAO/OIEA/OMS de expertos). Roma, p. 6, 8, 9, 23, 38, 39, 54, 57, 58, 1994.

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

FRAZIER, W.C. e WESTHOFF.D.C. *Microbiologia de los alimentos*. 4ªed. Zaragoza: Acribia, 1993. 681p.

FRANCO, R. M. *Escherichia coli*: ocorrência em suínos abatidos na grande Rio e sua viabilidade experimental em lingüiça frescal tipo toscana. Niterói, 2002. 153 p. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2002.

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

FRANCO, B.D.G.M.; GUTH, B. E.; TRABULSI, L. R. Isolamento e características de cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica isoladas de alimentos. *Revista de Microbiologia*, v.16, n.1, p.49-55, 1985.

GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L. Irradiação de Alimentos. In: Spolaore A.J.G. *Higiene e vigilância sanitária de alimentos*. São Paulo: Varela, 2001, p.421-442.

GERMANO, P.M.L.; OLIVEIRA,J.C.F. e GERMANO, M.I.S. O pescado como causa de toxinfecções bacterianas. *Higiene Alimentar* São Paulo: v. 7, n. 28, p. 40-45, 1993.

GUILLOT,J.F.; CHASLUS-DANCLA, E. e LAFONT, J.P. Spontaneous implantation of antibiotic resistance Enterobacteriaceae in the digestive tract of chickens in the absence of selective pressure. *Antim. Ag. Chemother.*, v.12, p.697-702, 1977.

HAGLER, A.N.; HAGLER, L.C.S.M. Microbiologia sanitária: indicadores microbiológicos de qualidade sanitária. In: Tratado de Microbiologia. ROITMAN, I. et al. (Ed.) São Paulo: Manole, 1988., p.83-102. v.1

HAREWOOD, P.; RIPPEY, S.; MONTESALVO, M. Effect of gamma irradiation on shelf life and bacterial and viral loads in Hard- Shelled Clams (*Mercenaria mercenaria*). *Applied and Environmental Microbiology*. v.60, n.7, p. 2666-2670, July, 1994.

HARTMAN, A.P.; DEIBEL, H.R. e SIEVERDING, M.L. Enterococci. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods*. 4ed. Washington APHA, 2001. Cap.9, p.83-87.

HAU, L.B., LIEW, M.H., YEH, L.T., 1992, "Preservation of grass prawns by ionizing radiation", *Journal Food Protection*, n° 55, v.3, p. 198-202.

HUSS, H. H. *Garantia da qualidade dos produtos da pesca*. Documentos técnicos das pescas da FAO, n.334. Roma, FAO, 1997., 182p.(Documentos técnicos das pescas da FAO). Roma: FAO, 1997. 182p.

ICMSF. INTERNATIONAL COMMISSION OF MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. *Microorganisms in food. Their significance and Methods of enumeration*. Toronto: University of Toronto, 2 ed., 1978. 434p.

JAY,J.M. *Microbiologia moderna de los alimentos*. 3° ed. Zaragoza: Acribia,1994, 1219p.

— ,J.M. Indicators of food microbial quality and safety. *Modern Food Microbiology*, 4th ed., Nova York: Van Nostrand Reinhold, 1991, p.413-433.

KLAPPENBACH, M. A. Lista preliminary de los Mytilidae brasileiros con claves para determinación y notas sobre su distribución. *Anais Acad. bras. Cienc.* V.37 (Supl.) , p.327-352, 13figs., 1965.

KORNACKI, J. L. ; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae Coliforms and Escherichia coli* as Quality and Safety Indicator In: DOWNES, F. P.; ITO,K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods*. 4ed. Washington. APHA, 2001. 676P. Cap.8, p.69-82

KUEH, C. S. W.; CHAN, K.Y. Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. *Journal of Applied Bacteriology*, v.59, p. 41-47, 1985.

LIMA,F.C. *Vibrio marinhos: Vibrio parahaemolyticus*. *Higiene Alimentar*, São Paulo: v.11, n.47, p.14-22, 1997.

LOAHARANU, P. International developments of food irradiation. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE IRRADIAÇÃO DE ALIMENTOS, 1997, México. **Anais...** México: [S.n.],1998. p.1-8.

MACHADO, I.C., et al. 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 da ostra (tecidos moles e líquido intravalvar). *Higiene Alimentar*, São Paulo, v.15, n.83, p.44-48, 2001.

MANAFI, M., KNEIFEL, W., BASCOMB, S. Fluorogenic and Chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiological Review*, n.55, p. 335-348, sep 1991.

MARINS, L. A. *Utilização da Radiação gama para 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.; PEREIRA,R.T.L. Mexilhões Biologia e Criação. Boletim técnico nº 12, Instituto de Pesca- Secretaria de Agricultura e Abastecimento- Coordenadoria de Pesquisa Agropecuária- Governo do Estado de São Paulo, 1988, 32p.

MARTIN, S. W.; MEEK, A H.; WILLEBERG, P. Veterinary Epidemiology Principles and Methods. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1987. 343p.

MAXCY,R.B. Irradiation of food for public health protection. *Journal of food protection*, Ames, v.45, p. 363, 1982

MAYER, M.D.B. *Alterações microbiológicas, físico-químicas e sensoriais durante a vida útil do camarão rosa (Penaeus brasiliensis e Penaeus paulensis) submetidos à radiação gama*. São Paulo, 2000. Tese de M.Sc. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2000.

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. *Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods*. 4ed. Washington APHA, 2001. 676p. Cap. 35, p. 331-341.

MENG,J.; ZHAO,S.; DOYLE,M.P.; JOSEPH,S.W. Antibiotic resistance of *E. coli* O157:H7 isolated from animals, food and humans. *Journal of food Protection*, v.61,n.11,p.1511-1514,1998.

MERCK, Microbiology Manual Cultura Media. Dormstadt, Germany, 405 p., 1996.

MIDURA, F. T.; BRYANT, G. R. Sampling plans, sample collection, shipment, and preparation for analysis, p. 13-23. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. *Compendium of Methods for Microbiological Examination of foods*. 4º ed. American Public Health Association, 2001, 676p.

MONTELLI, A.C; SADATSUNE,T. *Antibioticoterapia para o clínico*. SMB: Sociedade Brasileira de Microbiologia. Rio de Janeiro. P.7-53, 2001.

MORALES,A A. *La Evaluación Sensorial de Los Alimentos en la Teoría y La Práctica*. Espanha/ Zaragoza: Acribia. 1994.

MORELLI, et al. Indicadores de contaminação fecal para ostra do mangue (*Crassostrea rhizophorae*) comercializada na praia do Futuro, Fortaleza, Ceará. *Higiene Alimentar*, São Paulo: v.17, n.113, p.81-88, 2003.

MOSSEL, D. A. A. Processing for safety of meat and poultry by irradiation: progress, penury, prospect. In: SMULDERS, J. J. (ed) *Elimination of pathogenic organisms from meat and poultry*. Amsterdam: Elsevier, 1987.

MURRAY,B. Testing for high level aminoglycoside resistance in enterococcal infections. *European Journal Clinical Microbiology Infection Diseases*, v.9, n. 8, p.633-634, 1990.

NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*. Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Tests, v.12, n.20, dezembro 1992.

OLIVEIRA, V.M. *Contribuição ao Estudo da Qualidade da Carne de Rã (Rana catesbeiana) Fresca*. Niterói, 1996. Tese de M. Sc., Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, 1996.

OLSON, D. G. Irradiation of Food. *Food Technology*. v. 52, n. 1, p. 56-61, 1998.

ORDAL, Z.J. Current development in detection of microorganisms in foods. Influence or environmental factors on determination methods. *Journal of milk and food technology*, Ames, v.33, p.1, 1970.

ORGANIZATION MUNDIAL DE LA SALUD. La irradiation de los alimentos. Una tecnica para conservar y preservar la inocuidad de los alimentos. Organización Mundial de Salud, p. 90, Genebra, 1989.

ORTELLADO, J.; et al. Diarréia bacteriana em crianças menores de 5 anos. *Revista Paraguaia de Microbiologia*. v.19, n. 01 out. de 1999. Disponível em : <http://www.uma.py/medicina/microbiologia/articule9html>. Acesso em 15 mai.2002.

OSMER, R. Simultaneous detection of total coliforms and *E.coli* – Fluorocult LMX broth. *Food Microbiology*, n. 93, p.202, 1993.

OSTINI, S., GELLI, V. C. *Manual técnico de mitilicultura*. Instituto de pesca da Secretaria de Agricultura e Abastecimento de São Paulo, 1994. 34p.

PEREIRA, C.S. Isolamento de *Vibrio* sp. E enumeração de *Vibrio parahaemolyticus* a partir de moluscos bivalves marinhos comercializados in natura em restaurantes da cidade do Rio de Janeiro. Niterói, 1998. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal Fluminense, 1998, 101p.

PROBAC DO BRASIL. *Produtos Bacteriológicos* Ltda. Meios para identificação de enteropatógenos. Soros para identificação bacteriana. São Paulo. Brasil, 1998.

PSZCZOLA, D. E. 20 ways to market the concept of food irradiation. *Food Technology*, v. 51, n.2, p. 46-48, fev, 1997.

SACK, R. B. Human diarrhoeal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Annual. Review Microbiology*, v.29, p.333-353, 1975.

SAS Institute. *SAS User's Guide*. 6.04 Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC. 1999. 956p.

SHARF, J. M. *Exame Microbiológico de Alimentos*, editora Polígono, 1972. 257 p.

SIDALL, S.E. A clarification of the genus *Perna* (Mytilidae). *Bullettin of marine Science*, v.4, n.30, p.858-870, 1980.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A.SILVEIRA, N.F. *A Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: varela, 1997. 295p.

SIQUEIRA, A.A.Z.C. *Efeitos da irradiação e refrigeração na qualidade e no valor nutritivo da Tilápia (Oreochromis niloticus)*. São Paulo, 2001. Tese de M.Sc., ESALQ, São Paulo, 2001.

SPECK ,M.L.Selective culture of spoilage and indicator organisms. *Journal of milk and food technology*, Ames, v.33, p.163, 1970.

STONE, H .;SIDEL,J.L. *Sensory evaluation Practices*. Academic Press, Inc. New York . 1995. p.338.

TAYLOR , J. BETTELHEIM, K. A. the action of chloroform-killed suspension of enteropathogenic *Escherichia coli* on ligated rabbit-gut segments. *J. Gen. Microbiol.* v. 33, p. 309-313, 1966.

TAVARES, W. *Manual de Quimioterápicos Antinfeciosos*. Rio de Janeiro: Atheneu, 1990. 770p.

TEPER, C. B. *Parque de mexilhão da associação livre maricultores de Jurujuba* Niterói: ALMARJ, 1998. (Notas pessoais).

TRABULSI, L.R. *Microbiologia* 3.ed. Rio de Janeiro, São Paulo : Livraria Atheneu, 1989. 386p.

UNIFESP. Programa Bristol de Qualidade em Microbiologia. *Enterococcus faecalis e Enterococcus faecium resistentes a vancomicina*. Disponível em <http://www.unifesp.br/dmed/dipa/lemc/resultados%20PEM/cteste11.htm>. Acesso em 02 de dezembro de 2002.

VALENTE, A. M. *Verificação da Eficácia da Radiação Gama em mexilhões (Perna perna LINNAEUS, 1758)], através da contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e bactérias aeróbias psicrotróficas*. 2002, 40f. Monografia (Especialização em Irradiação de Alimentos) – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2002.

VALLE, R.P. Resíduos de antibióticos em alimentos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.7, n.7,p.206-208,1985.

VIANA, C.M., *Estudo bacteriológico do pescado refrigerado submetido à radiação gama*. Niterói, 1993. Apresentada para o Concurso de Professor Titular do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, 1993.

VIEIRA, K. V. M.;et al. O Influência das condições higiênico-sanitárias no processo de beneficiamento de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em filés congelados. *Higiene Alimentar*, São Paulo: v 14, n. 74, p. 37-40, 2000.

WOOD, P. C. *Manual de higiene de los mariscos*, Zaragoza: Acribia. 1996.

WONG, H., CHANG, M., FAN, J. Incidence of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. *Appl. Environ. Microbiol.* Washington, v.54, n.3, p. 699-702, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. High-dose irradiation: whole someness of food irradiated with doses above 10 KGy. Geneva; WHO,1990.

_____ ; Safety and nutritional adequacy of irradiated food, Geneva: WHO, 1994.

YUEH-JEN, Y., JIN-LAI, Z. , SHAO-CHUN, L., 1983, "Irradiation of Fresh Fish", *Radiation Physical Chemistry*, vol.22, p.779-785.

8 APENDICES

8.1: Quadro da análise de variância, em delineamento em bloco casualizado, dos escores de aceitação quanto ao aroma, em mexilhões de ambos os sexos, não irradiados e irradiados a 3kGy, 5kGy e 7kGy.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Probabilidade > F
		Aroma
Tratamento	3	0,88
Bloco (julgador)	59	-
Resíduo	177	-
Total	239	-

Modelo estatístico: $x_{ij}=m+t_i+b_j+e_{ij}$.

8.2: Quadro da análise de variância, de experimento fatorial em delineamento inteiramente casualizado, dos escores de aceitação quanto ao sabor, textura e impressão global em mexilhões do sexo feminino e masculino, não irradiados e irradiados a 3kGy, 5kGy e 7kGy.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Probabilidade > F		
		sabor	textura	Impressão global
Tratamento	3	0,14	0,08	0,32
Sexo	1	0,97	0,60	0,55
Tratamento* Sexo	3	0,62	0,35	0,59
Resíduo	232	-	-	-
Total	239	-	-	-

Modelo estatístico: $x_{ijk}=m+A_i+B_j+(A*B)_{ij}+e_{ijk}$.

8.3: Média e desvio padrão de escore de aceitação sensorial quanto ao aroma em mexilhões de ambos os sexos, não irradiados e irradiados a 3kGy, 5kGy e 7kGy.

Amostra	n	Aroma
Não irradiada	60	6,47 ± 1,57
Irradiada 3 kGy	60	6,33 ± 1,59
Irradiada 5 kGy	60	6,53 ± 1,57
Irradiada 7 kGy	60	6,55 ± 1,57

8.4: Média e desvio padrão de escore de aceitação sensorial quanto ao sabor, textura e impressão global em mexilhões do sexo feminino e masculino, não irradiados e irradiados a 3kGy, 5kGy e 7kGy.

Amostra	sexo	n	sabor	textura	Impressão global
Média e desvio padrão					
Não irradiada	Fêmea	30	6,27 ± 1,83	6,57 ± 0,44	6,30 ± 2,56
	Macho	30	5,97 ± 1,79	5,70 ± 1,40	5,87 ± 1,67
Irradiada 3 kGy	Fêmea	30	6,10 ± 1,71	5,50 ± 1,77	5,93 ± 1,66
	Macho	30	6,77 ± 1,71	6,50 ± 1,84	6,63 ± 1,58
Irradiada 5 kGy	Fêmea	30	6,60 ± 1,72	6,43 ± 1,86	6,23 ± 1,56
	Macho	30	5,97 ± 1,73	5,97 ± 1,88	6,10 ± 1,64
Irradiada 7 kGy	Fêmea	30	6,30 ± 1,72	6,20 ± 1,84	5,83 ± 1,60
	Macho	30	6,37 ± 1,67	6,17 ± 1,79	5,95 ± 1,62

8.5: Tabela de escala hedônica

NOME: _____ SEXO: _____
 IDADE: _____

F () M () Nº. AMOSTRA: _____

Por favor, avalie a amostra utilizando as escalas abaixo. Marque a posição que melhor reflita seu julgamento em relação à característica discriminada no alto de cada escala.

AROMA	SABOR	TEXTURA	IMPRESSÃO GLOBAL
Gostei Extremamente	Gostei Extremamente	Gostei Extremamente	Gostei Extremamente
Gostei Muito	Gostei Muito	Gostei Muito	Gostei Muito
Gostei Moderadamente	Gostei Moderadamente	Gostei Moderadamente	Gostei Moderadamente
Gostei Ligeiramente	Gostei Ligeiramente	Gostei Ligeiramente	Gostei Ligeiramente
Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente
Desgostei Ligeiramente	Desgostei Ligeiramente	Desgostei Ligeiramente	Desgostei Ligeiramente
Desgostei Moderadamente	Desgostei Moderadamente	Desgostei Moderadamente	Desgostei Moderadamente
Desgostei Muito	Desgostei Muito	Desgostei Muito	Desgostei Muito
Desgostei Extremamente	Desgostei Extremamente	Desgostei Extremamente	Desgostei Extremamente