

Fernanda Aparecida Ribeiro

**Análise do efeito de diferentes métodos de
conservação na determinação da contaminação da
carne do molusco bivalve *Tivela mactroides* por
coliformes totais e fecais**

**Centro Universitário da Fundação de Ensino Otávio Bastos
São João da Boa Vista, SP, 2004**

Fernanda Aparecida Ribeiro

**Análise do efeito de diferentes métodos de
conservação na determinação da contaminação da
carne do molusco bivalve *Tivela mactroides* por
coliformes totais e fecais**

**Orientadora: Daniela Franco Carvalho Jacobucci
Monografia apresentada como pré-requisito da
disciplina de Estágio Supervisionado do curso
de Ciências Biológicas.**

**Centro Universitário da Fundação de Ensino Otávio Bastos
São João da Boa Vista, SP, 2004.**

Data da defesa: ___/___/_____

Membros da banca

Nome completo: _____
Instituição

Nome completo: _____
Instituição

Nome completo: _____
Instituição

**Dedico este trabalho aos meus
pais, meus irmãos, meus
sobrinhos, Caio e Luis Gustavo,
meu cunhado Júlio e minha tia
Ângela.**

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Daniela e ao meu coorientador Alex por toda dedicação, paciência e crédito em mim devotado.

Agradeço à minha família por todo o carinho, a compreensão, toda ajuda e toda admiração. Em especial agradeço aos meus sobrinhos, Caio e Luis Gustavo, que a um ano e meio me fazem ver como Deus é perfeito e generoso conosco.

Aos meus amigos, Simone, Elaine, Potiguara, Mieko e Patrícia, por toda assistência que me deram, sendo me trazendo na faculdade ou me emprestando sua casa para dormir. E a todos os outros não citados pela paciência de me escutarem falando sobre Berbigão.

Ao Marquinho e ao Sorriso, do laboratório de microscopia, por toda ajuda e companhia durante a realização das análises.

Aos meus colegas de classe, Baiano e Adriana por terem realizado as coletas para mim.

À Fernanda Navarro, Leilane, Carla, Francine e outras mais por todos os momentos de descontração em meio às “pressões” da faculdade. Aliás tenho mais que agradecer à Carla, pois não posso me esquecer da coletas que realizou para mim, as caronas, as fofocas, o carinho, as referências entre outras milhões de coisas, mais em especial por sua amizade.

À Merylin, por sua companhia e ajuda nos dois últimos anos de faculdade e também pelas caronas.

Agradeço a mestra Tereza, por ter aceitado fazer parte da minha banca, além de arrumar várias referências para minha monografia.

Enfim agradeço à UNIFEOB, por ter cedido todos os equipamentos e produtos para que eu pudesse realizar minhas análises.

“Não permitas que ninguém negligencie o peso de sua responsabilidade. Tudo o que tem vida tem valor como um ser vivo, como uma manifestação do mistério da vida.”

"Um homem é verdadeiramente ético apenas quando obedece sua compulsão para ajudar toda a vida que ele é capaz de assistir, e evita ferir toda a coisa que vive." - Albert Schweitzer (1875-1965)

Sumário

1 – INTRODUÇÃO.....	
2 - RESUMO	
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	
3.1 - O MERCADO DO PESCADO E SUA UTILIZAÇÃO COMO ALIMENTO.....	
3.2 - HACCP E A PESCA NOS PAÍSES EM DESENVOLVIMENTO.....	
3.2.1 – Moluscos de interesse comercial.....	
3.2.2 – Biecologia de moluscos marinhos.....	
3.2.3 – Microbiologia de moluscos	
3.3 – PROBLEMAS DE SAÚDE PÚBLICA DEVIDO À CONTAMINAÇÃO POR PESCADO.....	
3.3.1 – Histórico de análises.....	
3.4 – COLIFORMES TOTAIS E FECAIS.....	
3.4.1 – <i>Escherichia coli</i>	
3.4.1.1 – Morfologia e identificação.....	
3.4.1.2 – Estrutura antigênica.....	
3.4.1.3 – Patogenia e manifestações clínicas.....	
4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	
4.1 – Área de coleta do material	
4.2 – Coleta das amostras de <i>Tivela mactroides</i>	
4.3 – Métodos de conservação	
4.4 – Análise de coliformes totais e fecais	
5 – RESULTADOS.....	
6 – DISCUSSÃO	
7 - CONCLUSÃO.....	
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	
9 - ANEXO	

1 – Introdução

O filo Mollusca, o segundo maior em número de espécies, apresenta um inequívoco grau de disparidade morfológica e representantes em quase todos os ambientes. Participam do cotidiano do homem desde a pré-história, principalmente como alimento, mas também como adorno, vetores de doenças, itens de coleção, produtores de pérolas, etc. Os representantes deste filo ocorrem desde as fossas abissais até as montanhas; das geleiras da Antártica até desertos tórridos. Existem moluscos predadores (até mesmo de vertebrados), herbívoros, ecto e endoparasitas, filtradores, comensais, sésseis, vágeis, pelágicos e neustônicos. Em certos ambientes representam grande biomassa e podem ser importantes na reciclagem de nutrientes (SIMONE, 1999).

Estimativas do número de espécies de moluscos no mundo variam entre 80.000 e 120.000, sendo que, destas, aproximadamente 1.600 ocorrem na costa do Brasil. No litoral do estado de São Paulo em particular, foi registrada a ocorrência de 578 espécies. Embora mesmo no supra e mediolitoral, tanto em praias quanto em costões rochosos, ainda existam muitas espécies por descobrir ou conhecer melhor, a maior carência de dados nos moluscos marinhos está em águas mais profundas, pois apenas recentemente este ambiente começou a ser explorado. Os manguezais, apesar de sua grande importância econômica como fonte de várias espécies comestíveis, tem sido muito pouco estudados quanto à malacofauna economicamente tão interessante. Mesmo espécies de bivalves de grande interesse econômico, carecem ainda de estudo sistemático profundo (SIMONE, 1999; BEIRÃO, 2002).

Fazendo parte desta estimativa, temos o molusco bivalve *Tivela mactroides* (BORN, 1778), da família Veneridae. Este molusco que vive em fundos arenosos (enterrado ou sob ele) desde Santa Catarina até o Ceará, sendo freqüente e comum. É considerado uma importante fonte de alimentação e renda para a população ribeirinha.

As mais sérias ameaças à biodiversidade malacológica marinha certamente são os diversos tipos de degradação ambiental. A construção de portos, com conseqüentes derramamentos de dejetos, petróleo, resíduos industriais, produtos de limpeza, afetam a fauna marinha, podem acarretar declínio da diversidade local e exclusão de espécies

menos resistentes (MIGOTTO *et al.*, 1993). O ambiente marinho vem sendo considerado como muito resistente às agressões do homem (VERMEIJ,1986), porém se tem notado que as populações das espécies que ali vivem, moluscos em particular, tem sofrido drásticas modificações, equiparáveis às que ocorrem em outros ecossistemas (CARLTON *et al.*, 1991).

Os problemas sanitários que afetam os produtos da pesca *in natura* foram analisados pela FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations)/OMS (Organização Mundial de Saúde) na Tailândia em julho de 1997 e associados com a contaminação biológica e química destes produtos. O grupo identificou, avaliou e quantificou os perigos potenciais para a população e, a partir destes resultados, como controlar, na prática, com programas aplicados no âmbito nacional e internacional estes problemas (LUPIN, 1999). As toxinfecções alimentares provocadas por parasitas, bactérias patogênicas, resíduos de agrotóxicos, medicamentos veterinários e metais pesados, foram os principais perigos identificados. As razões para a preocupação são diversas. Entre elas temos a poluição ambiental e os hábitos culturais tradicionais de preparação e consumo destes alimentos (BEIRÃO *et al.*, 2002).

Odores e sabores podem indicar problemas de qualidade, sejam eles provenientes da contaminação do pescado (gasolina, diesel, detergentes, desinfetante, etc.) ou mesmo de própria deterioração (azedo, amônia, pútrido) (BEIRÃO *et al.*, 2002). A manipulação de moluscos bivalves marinhos e do seu consumo *in natura* pode possibilitar o risco de contaminação cruzada. Os exames microbiológicos de moluscos bivalves, segundo GELLI *et al.* (1979), são indicativos da microbiota do ambiente marinho e da presença de contaminantes, inclusive patogênicos. Assim os resultados microbiológicos são como sentinelas para a saúde pública, no que tange ao controle de infecções alimentares (DIAS *et al.*, 2003; CUNHA NETO *et al.*, 2002).

Coliformes são indicadores de higiene no processamento de alimentos, dentre eles, a bactéria *Escherichia coli* é índice de contaminação fecal, podendo ser resistente a concentrações suaves de sal em alimentos (MURATORI, 1991). De um modo geral as *E. coli* podem multiplicar-se em alimentos e são necessárias de 10^5 a 10^7 UFC/g para causar infecção (SILVA *et al.*, 2001). Moluscos bivalves são considerados de qualidade satisfatória no momento da venda quando o número mais provável (NMP) de coliformes

fecais não exceder a 230/100g e a contagem total de aeróbios viáveis em placa a 35° C não for superior a 5×10^6 /g de amostra. Em nível de controle de qualidade, o marisco é considerado de boa qualidade quando o número de *Escherichia coli* estiver abaixo de 5 bactérias/g de carne e são esterilizados após dois minutos e meio em água fervendo (BEIRÃO *et al.*, 2002).

Este trabalho teve como objetivo comparar diferentes métodos de conservação (*in vivo*, resfriado e congelado), assim como o tempo de conservação do molusco bivalve *Tivela mactroides*, em relação à presença de coliformes totais e coliformes fecais. Foram utilizados os coliformes como parâmetro de contaminação do molusco devido a sua fácil identificação e ao baixo custo de análise.

2 - Resumo

A contaminação de alimentos tem aumentado a cada ano, e atualmente representa um risco potencial para a saúde humana. Coliformes Totais e Fecais foram isolados do molusco de areia *Tivela mactroides* e quantificados usando o Número Mais Provável (NMP) por grama de carne do molusco. O trabalho foi dividido em três experimentos. O primeiro com coletas em 04/07/2004, resfriamento do material a 4°C e análises de 9 amostras a cada 24 horas durante três dias. O segundo experimento teve as coletas realizadas em 12/07/2004, congelamento do material a 0°C e análises idênticas às do primeiro experimento. O último experimento teve as coletas realizadas no dia 18/7/2004 e caracterizou-se pela análise de amostras *in vivo*, resfriadas e congeladas, todas após 24 horas da coleta. Observou-se que o NMP para coliformes totais era bem maior que o NMP de coliformes fecais. A contaminação do Berbigão (nome popular do *Tivela mactroides*) se dá por despejo de esgoto no mar. Conclui-se que este alimento representa risco à saúde humana se não forem observadas práticas adequadas de preparação do alimento e que o melhor método de conservação da carne deste animal para análise de coliformes totais e fecais é o congelamento, pois neste caso mantevesse o NMP/g, em média, estável durante os três dias de conservação.

3 – Revisão Bibliográfica

3.1 – O mercado do pescado e sua utilização como alimento

O pescado pode ser comercializado nas formas *in natura* ou industrializado. A forma *in natura*, entende-se como o pescado recém-capturado, submetido ou não a refrigeração e adquirido pelo consumidor ainda em estado cru. A refrigeração do pescado inteiro compreende apenas a manutenção do mesmo em condições de resfriamento (por exemplo, em gelo) ou congelamento (em temperaturas abaixo de -18°C). A industrialização, por sua vez, compreende o pescado que, de alguma forma, sofre um processo mais elaborado de manuseio e preservação, tais como: preparação de filé, seguida de congelamento e estocagem por longos períodos até posterior comercialização; pescado salgado; pescado defumado; embutido de pescado; pasta de pescado; pescado enlatado; pescado fermentado; farinha de pescado; óleo de pescado. Outros produtos e sub-produtos também são aproveitados do pescado. Entre eles temos: barbatana de tubarão, cartilagem de pescado, algas como alimento, fertilizante, uso farmacêutico e industrial, pele e couro de pescado, bexiga natatória usada na fabricação de gelatina, cola e clarificação de vinhos, carapaça de crustáceos usada como fonte de fibra, extração de quitina, quitosana e D-glucosamina (OGAWA e MAIA, 1999).

Atualmente, tanto os peixes como os moluscos estão sendo comercializados no mercado interno. No caso dos camarões marinhos, cerca de 30 % da produção é destinada ao mercado interno, enquanto 70 % é exportada para os Estados Unidos, França, Espanha, Itália e Holanda (<http://masrv56.agricultura.gov.br/seap/index.htm>).

A globalização e o Mercosul têm permitido a abertura comercial para vários produtos de pescado, sendo ultimamente, facilmente encontrados nos supermercados e lojas brasileiras, produtos nacionais e internacionais, tais como o “Kani-Kama” congelado da Argentina (OGAWA e MAIA, 1999). Segundo o documento “Estado Mundial da Pesca e Aqüicultura em 2002” publicado pela FAO (Food and Agriculture of Organization of the United Nations) em 2003, a partir de 1970, a aqüicultura mundial

vem apresentando índices médios anuais de crescimento de 9,2%, comparados com apenas 1,4% na pesca extrativa e 2,8% na produção de animais terrestres. A China permanece como o maior produtor mundial, com 71% do volume e cerca de 50% em termos de valor. O potencial do Brasil para o desenvolvimento da aquicultura é imenso, uma vez que é constituído por 8.400 km de costa marítima, 5.500.000 hectares de reservatórios de águas doces (aproximadamente 12% da água doce disponível no planeta), clima extremamente favorável para o crescimento dos organismos cultivados, terras disponíveis e ainda relativamente baratas na maior parte do país, mão-de-obra abundante e crescente demanda por pescado no mercado interno (<http://masrv56.agricultura.gov.br/seap/index.htm>).

Embora as pesquisas voltadas para o cultivo de organismos aquáticos tenham se iniciado na década de 30 do século passado, as mesmas só foram intensificadas a partir de 1970. A aquicultura comercial brasileira se firmou como uma atividade econômica no cenário nacional da produção de alimentos a partir de 1990, época em que a produção de pescado cultivado girava em torno de 25.000 toneladas/ano. A produção de pescado no Brasil, na última década, tem-se mantido em torno de 750 mil toneladas anuais, constituída principalmente de peixes marinhos (BEIRÃO *et al*, 2002).

Aliada à pequena produção nacional, a falta de medidas que priorizem a qualidade do pescado por parte de pescadores e empresários tem contribuído para aumentar o desinteresse internacional por produtos de pescado brasileiro, incluindo o produto *in natura*. Para reverter tal tendência, é fundamental o desenvolvimento de ações para a melhoria da qualidade do pescado, avanços na tecnologia de utilização e processamento destes e aproveitamento de recursos não-utilizados, como a fauna associada (OGAWA e MAIA, 1999).

3.2 - HACCP e a pesca nos países em desenvolvimento

Um resumo histórico sobre a aplicação do sistema HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point System) na aquicultura indica que a primeira experiência ocorreu em 1989-1990, quando a NFI (National Fisheries Institute) em cooperação com o NMSF (National Marine Fisheries Service), organizaram seminários envolvendo a aplicação deste sistema de controle de qualidade na área de cultivos de camarão. O primeiro modelo regulamentar de HACCP aplicável na aquicultura foi publicado e distribuído pelo próprio NMSF em 1991. Em 1992 foi divulgada uma série de informações para aplicação e processamento do bagre (*Ictalurus spp.*), incluindo as operações de cultivo. Este ponto de partida influenciou muitos países, que, decidiram aplicar o sistema HACCP na aquicultura, empregando o enfoque integrado sanidade-qualidade-integridade econômica, preconizado pelo NMSF (BEIRÃO *et al.*, 2002).

Quando se desenvolve um programa do tipo HACCP, que se trata de um conjunto de normas para se obter um rígido controle da qualidade do produto alimentício, e uma análise dos riscos relacionada à maneira como se utiliza os produtos da aquicultura, é possível concluir que os produtos da aquicultura não apresentam maiores riscos que os produtos da pesca tradicional, exceção daqueles que são consumidos crus, em especial os moluscos bivalves e algumas espécies de pescado de água doce ou salobra. No entanto, os produtos da aquicultura podem apresentar riscos particulares, como a contaminação por antibióticos, medicamentos veterinários e herbicidas (BEIRÃO *et al.*, 2002).

A Comissão do Codex Alimentarius dispõe de uma revisão do Código de Práticas para Produtos Pesqueiros que inclui os produtos da aquicultura. O texto recomenda uma atenção especial ao controle de agentes patogênicos biológicos, como as bactérias e parasitas, contaminantes químicos e resíduos de medicamentos veterinários (www.codexalimentarius.com.br).

Segundo SANTOS (1999) um dos sistemas de produção alimentar que mais rapidamente se desenvolveu no mundo é a aquicultura, chegando a atingir uma taxa de crescimento equivalente a 9,6% ao ano na última década. Isto é importante pois este aumento está diretamente relacionado à contribuição que o sistema oferece para

diminuir a diferença entre as demandas e a oferta de produtos pesqueiros. A aquicultura comercial tem contribuído de maneira significativa para a economia dos principais países produtores e, em grande parte para com os países em desenvolvimento, nos quais as espécies de maior valor comercial se tornaram uma importante fonte de renda. O continente asiático, possuidor de uma das maiores tradições na área da aquicultura é capaz de produzir mais de 90% do volume total da produção mundial, seguido pela Europa (5,1%), América do Norte (2,2%) e América do Sul (1,4%).

Com relação aos países em desenvolvimento, a aplicação do sistema HACCP na aquicultura sofre uma influência relacionada à necessidade de se cumprir os requisitos sanitários impostos pelos principais países importadores destes produtos. Restrições de organismos oficiais, que regulam o consumo e estão envolvidos com o controle sanitário de alimentos no Japão, devido a uma importação de crustáceos contaminados com resíduos de pesticidas, forçaram o governo da Tailândia, Indonésia e Filipinas, a aplicarem um novo sistema de controle de qualidade. As mesmas restrições foram impostas pela Europa e Estados Unidos, acelerando o processo (BEIRÃO et al., 2002).

Para muitos países em desenvolvimento, a aplicação do sistema HACCP na indústria pesqueira tem sido conseguida através das atividades de capacitação e treinamento de pessoal desenvolvido pela FAO (OGAWA e MAIA, 1999). Produtores de salmão no Chile e camarão no Equador, Guatemala, Honduras e Panamá foram os primeiros grupos a aplicarem este sistema de controle de qualidade. A iniciativa foi seguida por cultivadores de truta, camarão e tilápia na Colômbia, Cuba, Brasil e Peru. Na Ásia, o sistema está praticamente limitado a países como a Indonésia, Malásia, Filipinas, Singapura, Tailândia e Vietnã. Estes países tem recebido assistência técnica considerável através de projetos canadenses envolvendo a tecnologia pesqueira. Os esforços desenvolvidos pela Tailândia merecem consideração especial, já que neste país, o Departamento de Pesca, conjuntamente com aquicultores e indústrias de processamentos, desenvolveram o Programa Nacional de Gerência de Qualidade, especialmente dirigido para o controle da contaminação do camarão por pesticidas, medicamentos veterinários e microorganismos patogênicos. No Vietnã, a possibilidade de utilizar o conceito e os princípios do HACCP para o controle de zoonoses

transmitidas pelo pescado é objeto de pesquisa por parte da FAO e a Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 1994 (BEIRÃO et al., 2002).

Na África, a utilização do sistema HACCP na aquicultura praticamente se concentra no cultivo de bivalves nos países situados ao norte do continente, como Marrocos e todos os programas tem influência européia, principalmente da França e Espanha (SANTOS, 1999).

A planificação e a aplicação do sistema HACCP devem ser consideradas com muito cuidado, tendo como base uma avaliação de viabilidade prática de sua execução em cada setor específico da pesca, nos riscos associados aos componentes e procedimentos do sistema de cultivo através da identificação apropriada dos pontos críticos de controle. O Brasil já regulamentou a exigência do HACCP para o pescado através do Ministério da Saúde – Portaria 1428 e Ministério da Agricultura – Portarias 11, 13 e 23/93. É importante mencionar que o HACCP pode se tornar uma barreira não tarifária, caso as empresas exportadoras não o tenham implantado (ABIA, 1998).

3.2.1 – Moluscos de interesse comercial

O comércio de moluscos tem crescido muito na última década. Isso devido ao fato do grande uso dos mesmos na culinária e como matéria-prima para artesanato (BEIRÃO *et al*, 2002). Entre os principais moluscos comercializados no Brasil temos as ostras. Pertencentes à família Ostreidae, medem de 7 a 10 cm, são desprovidas de pés e ligam-se a seu suporte com um cimento segregado pelo manto. Uma ostra produz milhões de ovos por ano e estes demoram de quatro a cinco anos para atingirem a maturidade (BARNES, 1980).

Conhecido popularmente como mexilhão, marisco ou ostra-de-pobre, o bivalve da família Mytilidaceae mais comercializado no Brasil é o *Perna perna* (Linnaeus, 1758). Esta espécie é encontrada em toda costa brasileira com exceção das áreas de mangue. Habita a região entre marés, sendo encontrado fixo a rochas ou qualquer estrutura dura imersa (<http://www.gep.cttmar.univali.br>).

Pertencente à família Veneridae, sub-família Meretricinae, temos o molusco de areia *Tivela mactroides*, que tem sua ocorrência registrada em grande abundância na Venezuela, tendo apenas um estudo com comunidades macrobentônicas, registrando sua alta densidade no Brasil. São muito usados para artesanato, mas sua principal utilização é na culinária, tendo, portanto, grande valor comercial. Vivem na região entre marés, sob a areia ou enterrados (MCLACHALAN *et al*, 1996).

3.2.2 - Bioecologia de moluscos marinhos

A classe Bivalvia, também chamada Pelecypoda ou ainda Lamellibrachia, é formada por moluscos conhecidos por bivalves, tais como mexilhões e ostras, os quais tem o corpo lateralmente achatado e possuem uma concha com duas valvas dorsalmente articuladas.

Os bivalves alimentam-se de plâncton, microorganismos e matéria orgânica em suspensão presentes na água, através de filtração pelas brânquias, as quais não possuem nenhuma capacidade seletiva, e sendo a ingestão dessas partículas limitada apenas pelo tamanho da boca (BARNES, 1990).

A composição da parte comestível de peixes, crustáceos e moluscos varia entre 70 a 85% de água, 20 a 25% de proteínas, 1 a 10% de gordura, 0,1 a 1% de açúcar e 1 a 1,5% de minerais. Essa composição é altamente variável de espécie para espécie, mas é comum a muitas espécies de peixes, crustáceos e moluscos o baixo conteúdo de gordura e a elevada quantidade proteínas (OGAWA e MAIA, 1999; BEIRÃO *et al.*, 2002). Quando comparados a outros tipos de pescado, os moluscos apresentam em sua carne um alto teor de carboidratos e menores concentrações de nitrogênio. Conseqüentemente, a deterioração de moluscos é essencialmente fermentativa.

A sazonalidade promove variações substanciais na composição das espécies pelágicas. A quantidade de gordura na carne de produtos marinho varia de acordo com as espécies, idade, parte do corpo, pré ou pós-desova e as condições nutricionais. De um modo geral, há uma correlação inversa entre os conteúdos de gordura e água nas mesmas espécies. A gordura dos produtos marinhos é altamente insaturada. Em estado inalterado constitui excelente fonte calórica e não acarreta elevação dos níveis de colesterol sanguíneo. Entretanto, o elevado índice de insaturação a deixa suscetível à oxidação, podendo se tornar rapidamente rançosa, especialmente quando se elaboram produtos salgados ou secos. Isso não apenas diminui a qualidade do produto mas também acarreta riscos, devido ao teor de peróxidos resultante da deterioração dos lipídios (OGAWA e MAIA, 1999; BEIRÃO *et al.*, 2002).

3.2.3 - Microbiologia de moluscos

No molusco vivo, o músculo abaixo da superfície da carne é considerado bacteriologicamente estéril. A maior concentração de microorganismos encontra-se no intestino, brânquias e muco superficial. O número e tipo de microorganismos encontrados no molusco recém capturado é influenciado por diversos fatores, tais como: localização geográfica da captura (lugares mais populosos geram maior contaminação), estação do ano e método de captura (BEIRÃO *et al*, 2002)

Em razão de seu hábito alimentar filtrador e por frequentemente serem consumidos crus ou levemente cozidos, os moluscos passa a ser um problema particular de saúde pública. Os mariscos, pelos quais passam grande quantidade de água durante o processo de filtração, recolhem desta maneira os microorganismos que tem origem no solo e na água, incluindo os patogênicos presentes. As maiorias dos moluscos são capturadas em águas estuarinas e assim há a possibilidade de contaminação com patógenos do esgoto, bem como pelo ambiente. Ostras e vieiras são raspadas ou puxadas do fundo, enquanto que o berbigão é usualmente retirado da areia na maré baixa por coleta manual, o que pode agregar carga microbiana ao pescado.

Devido à forma de consumo, os moluscos são vistos como alimento de alto risco e estão largamente associados a envenenamento alimentar, provavelmente como consequência do aumento da poluição ambiental. Moluscos são os maiores veículos do vírus da hepatite A (BROOKS, 1998).

Desta forma, o monitoramento da qualidade da água, considerando o índice de coliformes totais e fecais, presença de metais pesados e fitotoxinas, e ainda os exames químicos, microbiológicos e sensoriais da própria carne do pescado, fornecendo informações necessárias à saúde do consumidor (OGAWA e MAIA, 1999).

3.3 – Problemas de saúde pública devido à contaminação por pescado

Estatísticas publicadas pela Organização Mundial de Saúde (O.M.S.) constataam que as infecções bacterianas constituem a maioria das doenças transmissíveis pelo pescado. Elas podem ser devidas à contaminação direta do produto com água contaminada ou à contaminação secundária através de descarga, processamento, estocagem, distribuição e preparo para o consumo. A contaminação direta do pescado com água contaminada é de particular importância, quando os produtos são consumidos crus ou após tratamento térmico brando. A contaminação secundária tem, em geral, maior importância nas regiões em que imperam condições sanitárias deficientes (BROOKS, 1998).

As águas mundiais estão sujeitas a diversos contaminantes de origem antrópica. O fósforo e o nitrogênio provenientes geralmente da agricultura provocam, entre outras causas, a eutrofização de rios, lagos, estuários e das costas oceânicas (CARPENTER *et al*, 1998).

A construção de portos, com conseqüentes derramamentos de dejetos, petróleo, resíduos industriais, produtos de limpeza, afetam a fauna marinha e provocam diversos casos de toxinfecção alimentar, principalmente em populações ribeirinhas (MIGOTTO *et al.*, 1993).

Entre as principais doenças transmitidas pela água e pelo pescado estão: infecções bacterianas causada por enterobactérias, como *Shigella* e *Salmonella*; gastroenterites causadas pela *Escherichia coli*; salmoneloses; febre tifóide (causada por *Salmonella typhi*); shigelose; cólera; brucelose; botulismo; hepatites; amebíase entre outras (PELCZAR *et al.*, 1981 e 1996).

Dos 1586 surtos de doenças de origem alimentar relatados no Brasil entre 1977 – 1984, os alimentos marinhos foram responsáveis por 24,8%. O pescado (peixes e moluscos) foi responsável por 59% do total dos alimentos marinhos, sendo que os bivalves foram responsáveis por 1/3 destes casos (OGAWA e MAIA, 1999).

Alimentos marinhos são suscetíveis a todos os organismos comuns de toxifecção alimentar, bem como aqueles que são exclusivos de ambientes marinhos

como *Clostridium botulinum* tipo E, *Vibrio spp*, *Proteus spp*, e o vírus Norwlk. Organismos relacionados à saúde pública, comuns a todos os alimentos, incluem *Salmonella*, *S.aureus* e *C.perfringens* (BROOKS, 1998).

Recentemente, grande interesse tem se dado para a presença de microorganismos tais como: *Yersinia enterocolitica*, *E.coli*, *V.cholerae*, *V. vulnificus*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides* e *Listeria monocytogenes* (BEIRÃO et al., 2002).

3.3.1 – Histórico de análises

Desde o final do século passado e início deste, os cientistas e autoridades em saúde pública têm recomendado a procura e o encontro de uma espécie de bactéria isolada de material fecal humano como parâmetro de avaliação do grau bacteriológico de uma poluição e/ou contaminação da água. Inicialmente nomeado como *Bacterium coli*, foi posteriormente renomeado como *Bacillum coli* e ainda, mais tarde, *Escherichia coli* (WAITE, 1997). O critério cultural proposto para detecção e identificação desse "bacilo Gram negativo, não esporulado, aeróbio/anaeróbio" era somente baseado em sua capacidade de "fermentar a lactose com produção de ácido e gás em até 48 horas a 35 °C". Desde então, esse microorganismo tem sido recomendado como a variável bacteriológica e parâmetro indicativo da situação ou controle da qualidade pelos serviços de abastecimento d'água no mundo todo (ROZEN e BELKIN, 2001).

Com o desenvolvimento da microbiologia sanitária, vários estudos têm mostrado que esse critério permite a detecção de uma série de microorganismos tanto de origem fecal como ambiental. Ao longo dos anos, vários gêneros da família Enterobacteriaceae, como *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter* foram isolados de amostras de água a partir do mesmo critério anteriormente atribuído apenas à *Escherichia coli* (GELDREICH, 1997). Em amostras de águas não poluídas por fezes o coliforme mais comumente isolado tem sido o *Enterobacter aerogenes*, enquanto a *Escherichia coli* tem sido mais isolada de amostras de águas poluídas por fezes. Dessa

forma essas variáveis foram apontadas como parâmetro artificialmente classificado como grupo “coliformes”.

Considerando, que apenas os microorganismos de origem fecal deviam ser utilizados como indicadores da qualidade da água, vários testes foram propostos para a diferenciação entre os coliformes de origem fecal e aqueles de outras origens. Dentre esses testes, a quantidade de gases formados (H_2 e CO_2), a utilização de vários açúcares e liberação de produtos do catabolismo como indol e a acetoina, foram propostos como critérios de separação entre os sub-grupos fecais e não fecais (HELCIAS, 2004).

Entretanto com a dificuldade em se utilizar esses diferentes testes nos exames de rotina adotou-se um que era apenas baseado na suposta capacidade dos coliformes de origem fecal fermentarem a lactose à temperatura de 44,5°C. Esse teste, denominado “temperatura elevada” foi sendo utilizado como critério suficiente para a detecção de coliformes fecais. No entanto, estudos mais avançados têm revelado ser esse critério insuficiente para essa finalidade (DUNCAN,1988). Outros estudos mostraram que variações mínimas dessa temperatura podem ser suficientes para invalidação do teste. Ainda, algumas linhagens de *Escherichia coli* são incapazes de produzir gás em lactose tanto a 35 como em 44,5 °C, o que determina resultados falso-negativos (DUFOR, 1977). Estima-se em 12% o percentual de coliformes que não produzem gás nos testes de fermentação da lactose e entre 15 e 20% a faixa percentual de coliformes que não desenvolvem colônias com o brilho metálico típico nos meios tipo Endo (EVANS *et al*, 1981).

RAMTEKE *et al* (1992) avaliando águas naturais em diferentes regiões da Índia, encontraram que 96 a 99% dos coliformes termotolerantes, ou seja, tolerantes à temperatura, eram *E. coli* em águas superficiais enquanto que em águas subterrâneas esse percentual descia para 54 a 61%. Observaram, também, que uma grande diversidade na microbiota das regiões tropicais contribui para a redução da eficiência do teste para coliformes termotolerantes. NIEMI *et al* (1997) verificaram que em despejos industriais, altas concentrações de espécies coliformes termotolerantes não fecais interferiram seriamente na detecção de *E. coli*, recomendando o uso dessa espécie como a variável e parâmetro para avaliação da contaminação de águas naturais.

Coliformes termotolerantes dos gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter* têm sido isolados de águas e de despejos de fábricas de papel. (BAGLEY et al., 1978). Espécies do gênero *Klebsiella* têm sido isoladas de ambientes aquáticos sem qualquer perturbação sanitária e, principalmente, das superfícies internas de canalização de água potável, formando biofilmes que as mantêm persistentes nesses ambientes por vários meses, inclusive proporcionando condições de proliferação. (MCFETERS et al, 1984; PARKER et al, 1997).

3.4 – Coliformes

Os coliformes, pertencentes à família Enterobacteriaceae, representam a maior e mais heterogênea coleção de bacilos Gram-negativos de importância clínica. Apesar da complexidade desta família, mais de 95% dos microorganismos isolados clinicamente importantes pertencem a apenas 10 gêneros e incluem menos de 25 espécies (PELCZAR *et al.*, 1996; BROOKS *et al.*, 1998; MURRAY *et al.*, 2000).

As Enterobacteriaceae são microorganismos ubíquos encontrados em todo mundo no solo, na água, na vegetação e fazem parte da flora intestinal normal da maioria dos animais, incluindo os seres humanos. Estas bactérias produzem uma variedade de doenças humanas, incluindo 30 a 35% de todos os casos de septicemia, mais de 70% das infecções das vias urinárias e muitas infecções intestinais (MURRAY *et al.*, 2000).

Os Coliformes Totais, sem dúvida alguma, não são e nem devem ser, definitivamente, usados como parâmetro único ou essencial de avaliação das condições sanitárias de ambientes aquáticos, embora, devido à sua simplicidade de processamento e larga documentação de uso essa variável deverá ainda continuar sendo aplicada, indicando parâmetros em avaliações dos processos de tratamento e da integridade das unidades de distribuição dos sistemas de abastecimento.

Dessa forma recomenda-se a utilização do grupo de Coliformes para avaliação de processo de tratamento e da *E. coli* como parâmetro quando da simples avaliação bacteriológica da água na fonte. Porém, é aconselhável a inclusão de parâmetros microbiológicos auxiliares como Clostrídios sulfito - redutores e Colifagos para otimizar o controle da qualidade da água dos sistemas de abastecimento (HELCIAS, 2004).

A contagem dos chamados coliformes totais corresponde ao total de microrganismos "gram negativos" encontrados em uma amostra. Já a contagem dos coliformes fecais, indica a quantidade dos microrganismos oriundos de excretas humanos, portanto com risco de serem possivelmente patogênicos. Ao nível de saúde pública e/ou quanto a comercialização de produtos destinados ao consumo humano

(organismos aquáticos), é obrigatório a implantação de monitoramento desses coliformes.

Os *Coliformes Termotolerantes*, anteriormente assumidos como *C. fecais*, não é tido como variável e parâmetro sensível para uma avaliação criteriosa da exposição de ambientes aquáticos a poluição fecal, humana e animal. Nesse sentido, uma vasta documentação técnico-científica sustenta a utilização da espécie *Escherichia coli*, (CERQUEIRA *et al*, 1998).

A variável definida como o parâmetro que melhor avalia o nível de poluição fecal dos ambientes de simples processamento e que se encontra já padronizado e devidamente documentado é a *Escherichia coli*. Pode-se complementar esse parâmetro e melhorar os laudos microbiológicos no sentido de definir tanto a poluição fecal quanto a possibilidade de sua origem utilizando-se outra variável, o parâmetro "Enterococcus" (CHARRIERE *et al*, 1994), ou seja, o encontro e a quantidade desses microorganismos na amostra.

Estão sendo padronizadas e simplificadas as técnicas de detecção e identificação de outras variáveis microbiológicas para funções similares a que eram atribuídas aos "coliformes fecais" como o *Clostridium perfringens*. Esse microorganismo, por ser esporulado informa sobre poluições fecais mais remotas, comparadas com aquelas indicadas pela presença de *E. coli* assim como pode assegurar ausências de microorganismos patogênicos de maior persistência que essa mesma espécie.

Outra variável a ser assimilada é o encontro dos Colifagos, que são vírus bacteriófagos de *E. coli* e podem informar sobre a eficiência do tratamento da água na remoção dos Enterovírus e outros vírus como o da hepatite de veiculação hídrica.

A Microbiologia Ambiental e Sanitária tem evoluído, e nesses últimos dez anos experimentou grande progresso em função das tecnologias emergentes. A detecção e identificação simples e rápida da *E. coli* para fins de monitoramento de mananciais tem sido possível nesses últimos 5 anos através dos testes cromo-fluorogênicos baseados em expressões enzimáticas dessa, e de outras, bactérias.

Avaliações da sensibilidade e confiabilidade desses testes têm sido feitas em todo o mundo e, principalmente em climas tropicais e subtropicais onde os perfis de

ocorrência de “Coliformes Termotolerantes e de *E. coli*” apresentam contornos característicos mostrando, cada vez mais, a qualidade do uso dessa espécie, (*E.coli*), como parâmetro de definição de impactos fecais, pois já passa o tempo de acertos nos conceitos e terminologias que melhor representem os objetivos sanitários e ambientais de medições da contribuição fecal (HELCIAS, 2004).

Os órgãos ambientais, em áreas balneárias, utilizam-se da *Escherichia coli* como indicador para diagnosticar também as condições para o banho de mar e em água doce. Esse serviço informa à população a adequabilidade ou não de banho junto às águas de balneários diversos, classificando-as com “excelente, muito boa, satisfatória e imprópria” e é denominado de “condições de balneabilidade”.

Atualmente, devido aos sistemas e testes de substratos cromogênicos, específicos para algumas espécies utilizadas como parâmetros indicadores, a detecção de *E. coli* tornou-se mais simples que a de coliformes termotolerantes (ex-fecais). Por dispensar o uso de temperatura elevada ($44,5 \pm 0,2$ °C) que exige controle rígido de sua variação, agora o teste para *E. coli* utiliza meios aos quais são incorporados substratos que possam ser hidrolizados por enzimas específicas da espécie (ALLEN, 1997).

Comumente são empregados substratos como b- D-glucoronida ao qual são incorporados radicais cromogênicos como o 5-bromo-4 cloro-3 indolil ou 4-metilumbeliferil . Existem, atualmente, várias formas de apresentação comercial desses substratos, pulverizados ou desidratados. Comumente aqueles pulverizados apresentam maior facilidade de uso enquanto são mais caros que aqueles desidratados que exigem etapas de pesagem, hidratação, esterilização e estocagem refrigerada para uso. (THOMAS *et al*, 1997).

Essas detecções podem ser no formato Presença-Ausência ou no formato de Quantificação, tanto através do Número Mais Provável quanto por Filtração Por Membrana. A precisão e limite de detecção são superiores nos testes de substratos cromogênicos por serem esses processos dependentes de enzimas constitutivas da espécie.(APHA, 1995).

Em fezes humanas a contribuição da *E. coli* é praticamente de 100%, (96,8%), quando comparada com outros microorganismos ai presentes. Esse percentual foi obtido em estudo sobre o Perfil de Coliformes Termotolerantes e de *Escherichia coli* em

diferentes amostras de água (CERQUEIRA *et al*, 1998). As espécies fecais Não *E. coli* como algumas dos gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter* são de ocorrência variável e não apresentam características fisiológicas ainda disponíveis que possam ser identificadas em sistemas "in vitro" de detecção. Os percentuais de ocorrência desses gêneros em fezes humanas e animais têm sido avaliados em vários estudos (HELCIAS, 2004).

3.4.1 – *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* consiste em cinco espécies, e a *E.coli* é a mais comum e clinicamente importante. Este microorganismo está associado a uma variedade de doenças, incluindo meningite, gastroenterite, infecção das vias urinárias e sepse. Conforme esperado, a profusão de cepas capazes de provocar doença reflete-se na diversidade antigênica das bactérias (TRABULSI *et al.*, 1999; MURRAY *et al*, 2000).

A *Escherichia coli* faz parte da microbiota intestinal normal do homem, estando sempre presente nas fezes sem causar nenhum sinal ou sintoma no hospedeiro, a não ser em crianças pequenas ou pessoas debilitadas. Embora apareça apenas em animais de sangue quente, a sua presença varia, ao menos, em quantidades diferentes, porém sempre predominante, assim está presente em 100% de gatos e cavalos, 99,9% nos bovinos, 96,8% no homem e 83,5% no porco, comparada aos outros possíveis coliformes fecais (SUWANSONTHICHAJ e RENGPIPAT, 2003).

A linhagem *E. coli* enteropatogênica, causadora de infecções intestinais, corresponde a menos de 1% da população dessa espécie em água poluída (WANI *et al.*, 2003).

Em hidrobiologia sanitária deve-se considerar a bactéria “termotolerante *Escherichia coli*” por ser de origem fecal humana e animal recente, quando em

percentuais confiáveis para sua utilização, como “parâmetro de definição da poluição fecal” e para “uso de fontes” de água (HELCIAS, 2004).

Segundo a Portaria/MS nº1469-29/12/00, - Norma de qualidade da água para consumo humano -; “*Escherichia coli*: - bactéria do grupo coliforme que fermenta a lactose e o manitol com produção de ácido e gás a $44,5 \pm 0,2$ °C em 24 horas, produz indol a partir do triptofano, oxidase negativa, não hidroliza a uréia e apresenta atividade das enzimas b-galactosidase e b-glucuronidase é considerada o mais específico indicador de contaminação fecal recente e de eventual presença de organismos patogênicos.

Algumas espécies de bactérias do grupo coliforme podem sobreviver e, ainda, proliferar em ambientes aquáticos tropicais, insistindo então em definir a variável microbiológica *Escherichia coli* como parâmetro de escolha na avaliação bacteriológica de fontes de abastecimento, em geral (HELCIAS, 2004).

O artigo "Regulamento para Água de Consumo, - Uma Perspectiva Européia", WAITE (1997) aponta por razões mais pragmáticas que científicas, a prática de se monitorar através do parâmetro coliformes fecais ou termotolerantes em lugar da denominação de espécie fecal *Escherichia coli* tem ganho larga adoção.

A Portaria/MS nº1469-29/12/00 orienta que amostras com resultados positivos para coliformes totais devem ser analisadas para *E. coli* e, ou, “coliformes termotolerantes”, devendo, neste caso, ser efetuada a verificação e confirmação dos resultados positivos. Em água para consumo humano em toda e qualquer situação, incluindo fontes individuais como poços, minas, nascentes, dentre outras a detecção de *E. coli* deve ser preferencialmente adotada, como também em água tratada no sistema de distribuição, como em reservatórios e rede (HELCIAS, 2004).

Além de controlar a qualidade da água, a *E. coli* é um bom indicador da qualidade do pescado, sendo sua análise essencial no ponto de vista de controle de qualidade, para a exportação para alguns países (DUPONT *et al.*, 2004).

3.4.1.1- Morfologia e identificação

Existem centenas de gêneros e milhares de espécies de bactérias, representando uma ampla variedade de propriedades morfológicas e fisiológicas. Quanto à morfologia, muitas bactérias são simples, mas algumas possuem formas e arranjos incomuns. Algumas são capazes de viver em ambientes extremos devido à capacidade metabólica única que apresentam, mostrando que as bactérias são ubíquas e diversificadas, desenvolvendo-se em quase todos os lugares da Terra (PELCZAR *et al.*, 1996).

As Enterobacteriaceae são bastonetes Gram-negativos curtos, que podem formar cadeia e sua morfologia típica é observada durante o crescimento em meios sólidos *in vitro*, porém é altamente variável em amostras clínicas (BROOKS *et al.*, 1998). São bacilos anaeróbios facultativos e quando crescem em meio anaeróbio obtêm sua energia da fermentação (PELCZAR *et al.*, 1996).

A *E.coli* forma colônias lisas, circulares e convexas com bordas bem definidas e algumas cepas produzem hemólise em meio de cultura ágar-sangue. Tipicamente *E.coli* produz reações positivas para indol, lisina-descarboxilase e fermentação de manitol, além de gás a partir da glicose. Os microorganismos isolados podem ser rapidamente identificados como *E.coli* pela sua hemólise em ágar-sangue, pela morfologia típica das colônias com brilho iridescentes em meios diferenciais como o ágar EMB (Fig. 1), e pela positividade da prova do indol. Mais de 90% das amostras de *E.coli* são positivas para β -glicuronidase quando se utiliza o substrato 4-metilumbeliferil- β -glucuronídeo (MUG). (BROOKS *et al.*, 1998). *Escherichia coli* pode crescer muito bem em meios contendo um único composto orgânico, tal como um açúcar mais íons inorgânicos, de forma rápida (24-48 horas para crescimento) e economia que a inoculação em placas traz em relação a testes sorológicos (PELCZAR *et al.*, 1996).

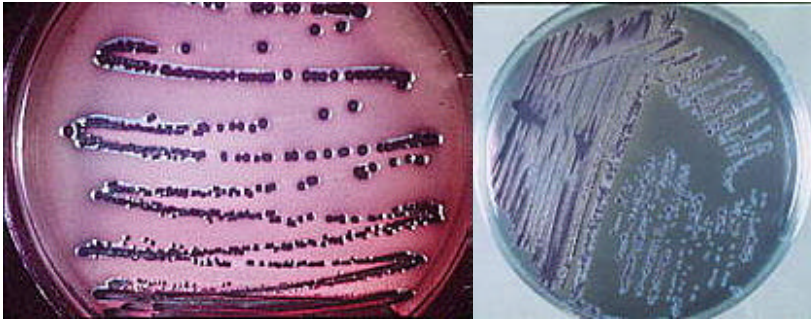


Figura 1 - Placas de EMB com crescimento de *E.coli*.

3.4.1.2 - Estrutura antigênica

As Enterobacteriaceae são classificadas por mais de 150 antígenos somáticos O termoestáveis diferentes, por mais de 100 antígenos K termolábeis e por mais de 50 antígenos H. A *Escherichia coli* é atualmente encarada como um gênero possuidor de uma só espécie, na qual existem várias centenas de diferentes tipos antigênicos. Os tipos são caracterizados por diversas combinações de antígenos O (antígenos lipopolissacarídeos somáticos), K (antígenos polissacarídicos capsulares) e H (antígenos proteicos flagelares), dando origem a vários milhares de sorotipos (PELCZAR *et al.*, 1981).

Os antígenos O constituem a parte mais externa do lipopolissacarídeo da parede celular e são constituídos em unidades repetidas de polissacarídeos. Os anticorpos dirigidos contra os antígenos O são predominantemente IgM. *E.coli* partilha um ou mais antígenos O com *Shigelas* e pode exibir reação cruzada com algumas espécies de *Providencia*, *Klebsiela* e *Samonella*. Em certas ocasiões, os antígenos O específicos de *E.coli* podem estar associados a doenças humanas específicas, como diarréias e em infecções das vias urinárias. Os antígenos K podem interferir na aglutinação por anticorpos O, podendo estar associados à virulência. Cepas de *E.coli* produtoras de antígeno K1 são mais proeminentes na meningite neonatal, e os antígenos K de *E.coli* promovem ligação de bactérias do trato gastrointestinal ou urinário. Os antígenos H localizam-se nos flagelos e são desnaturados ou removidos pelo calor ou pelo álcool.

Os antígenos H aglutinam-se com anticorpos anti-H, sobretudo IgG. Os antígenos H da superfície bacteriana podem prejudicar na aglutinação por anticorpo anti-O (BROOKS *et al*, 1998).

3.4.1.3 - Patogenia e manifestações clínicas

E.coli constitui a causa mais importante de infecção do trato urinário, sendo responsável por cerca de 90% das primeiras infecções das vias urinárias em mulheres jovens. Os sinais e sintomas incluem freqüência urinária, disúria, hematúria e piúria. A dor no flanco está associada à infecção das vias urinárias superiores. Nenhum desses sinais ou sintomas é específico de infecção por *E.coli*. A infecção do trato urinário pode resultar em bacteriemia com sinais clínicos de sepse.

Tipicamente, *E.coli* nefropatogênica produz hemolisina. A maioria das infecções é provocada por alguns sorotipos de *E.coli*. O antígeno K parece ser importante na patogenia da infecção do trato superior.

A *E.coli* que provoca diarreia é extremamente comum no mundo inteiro, sendo então classificadas pelas suas propriedades de virulência, e cada grupo provoca diarreia através de um mecanismo diferente. As propriedades de aderência às células epiteliais do intestino delgado ou do intestino grosso são codificadas por genes plasmidiais. De modo semelhante, as toxinas são quase sempre mediadas por plasmídios ou por fagos.

E.coli enteropatogênica (EPEC) constitui uma importante causa de diarreia em lactentes, sobretudo nos países em desenvolvimento (BROOKS *et al.*, 1998). Embora os sorotipos O específicos tenham sido associados a surtos de diarreia por EPEC em berçários, a sorotipagem de *E.coli* isolada ao, acaso ou na doença endêmica é desencorajada, exceto em pesquisas epidemiológicas. Ocorre doença devido a aderência do microorganismo à membrana plasmática do enterócito, causando

destruição das microvilosidades adjacentes. Por conseguinte, estas cepas são denominadas *E.coli* enteroaderentes. A diarreia provavelmente resulta da perda das propriedades absorptivas das células infectadas. Não foi encontrada nenhuma toxina (MURRAY *et al.*, 2000).

A *E.coli* enterotoxigênica (ETEC) representa uma causa comum de “diarreia do viajante” e uma causa importante de diarreia em lactentes de países em desenvolvimento (BROOKS *et al.*, 1998; HELCIAS, 2004).

A “diarreia do viajante” ataca cerca de 100 milhões de pessoas, entre os 250 milhões que realizam viagens internacionais por ano. Destes viajantes, 30% ficam confinados à cama, e outros 40% são forçados a diminuir suas atividades. As causas mais comuns desta moléstia são as cepas patogênicas de *Escherichia coli*, que são responsáveis por 40 a 70% de todos os casos e os sintomas variam de moderados a graves e incluem náuseas, vômitos, diarreia, inchaço, mal-estar e dor abdominal. Um caso típico causa de 4 a 5 defecações por dia durante 3 ou 4 dias. A perda de líquido é maior em cepas invasivas do que em cepas toxigênicas. A doença é especialmente perigosa em crianças, que estão sujeitas a uma grave desidratação. Crianças que se alimentam com mamadeiras são muito mais susceptíveis de se tornar infectadas do que aquelas que mamam no peito. Antes que sua microbiota normal esteja suficientemente estabelecida para competir com os patógenos, os recém-nascidos apresentam maior chance de serem infectados por profissionais da área da saúde. Os viajantes algumas vezes se automedicam com antibióticos antes e durante sua estadia no estrangeiro, o que não é recomendado, pois os antibióticos geralmente não são eficazes contribuindo, desta forma, com o desenvolvimento de cepas mais resistentes. Um melhor procedimento é a manipulação de medicamentos antidiarréicos e utilizá-los somente depois do aparecimento dos sintomas. A diarreia do viajante pode persistir por meses ou anos como uma síndrome intestinal pós-infecciosa. Pode também causar intolerância à lactose pelos danos às células do revestimento intestinal que normalmente produzem a enzima lactase, que digere a lactose (BROOKS *et al.*, 1998; BLACK, 2002).

A aderência de ETEC às células epiteliais do intestino delgado é promovida por fatores de colonização específicos para seres humanos. Os indivíduos que residem em regiões em que esses microorganismos são altamente prevalentes são menos

susceptíveis a desenvolver diarreia por ocasião de nova exposição a *E.coli* produtora de LT (exotoxina termolábil). Algumas cepas de ETEC produzem a enterotoxina termoestável (ST), assim como muitas cepas de ST positivas produzem LT, sendo que ambas as toxinas provocam diarreia mais grave (MURRAY *et al.*, 2000).

Os plasmídios que transportam os genes das enterotoxinas (ST,LT) também transportam genes dos fatores de colonização que facilitam a aderência das amostras de *E.coli* ao epitélio intestinal. Os fatores de colonização reconhecidos ocorrem com especial frequência em alguns sorotipos. É possível que qualquer *E.coli* possa adquirir um plasmídio que codifica enterotoxinas. Não existe nenhuma associação definida da ETEC com as cepas de EPEC que provocam diarreia em crianças. De forma semelhante, não há nenhuma associação entre cepas enterotoxigênicas e cepas capazes de invadir as células epiteliais intestinais (MURRAY *et al.*, 2000).

A *E.coli* enteroemorrágica (EHEC) produz verotoxina, assim denominada em virtude de seu efeito citotóxico sobre as células Vero, uma linhagem de células renais de um macaco verde africano. Existem pelo menos duas formas antigênicas da toxina. EHEC tem sido associada à colite hemorrágica e a síndrome uro-hemolítica, uma doença que resulta em insuficiência renal aguda, anemia hemolítica microangiopática e trombocitopenia. Ao contrário da maioria das outras *E.coli*, esta não utiliza o sorbitol e não se desenvolve em meio MacConkey e também são negativas em testes MUG. Muitos casos de colite hemorrágica podem ser evitados pelo cozimento completo do alimento (PELCZAR *et al.*, 1981; BROOKS *et al.*, 1998; MURRAY *et al.*, 2000).

A *E.coli* enteroagregativa (EAEC) provoca diarreia aguda e crônica em indivíduos que se encontram em países em desenvolvimento. Caracteriza-se pelo seu padrão típico de aderência às células humanas. Pouco se sabe a respeito dos fatores de virulência da EAEC e da epidemiologia da doença (PELCZAR *et al.*, 1981; BROOKS *et al.*, 1998; MURRAY *et al.*, 2000).

A *E.coli* enteroinvasiva (EIEC) produz uma doença muito parecida com a shigelose. A doença afeta mais comumente crianças em países em desenvolvimento e pessoas que viajam para esses países. A exemplo da *Shigella*, as cepas de EIEC não fermentam a lactose ou são fermentadores tardios e não são móveis. EIEC produz

doença ao invadir as células epiteliais da mucosa intestinal (PELCZAR *et al.*, 1981; BROOKS *et al.*, 1998; MURRAY *et al.*, 2000).

Sepse – Quando as defesas normais do hospedeiro não estão adequadas, *E.coli* pode atingir a corrente sanguínea e provocar sepse. Os recém-nascidos são altamente susceptíveis à sepse, uma vez que carecem de anticorpos IgM. Pode ocorrer sepse secundária em consequência de infecção das vias urinárias.

Meningite – *E.coli* e os estreptococos do grupo B constituem as principais causas de meningites em lactentes. Cerca de 75% de destes casos apresentam o antígeno K1. Este antígeno exhibe reação cruzada com o polissacarídeo capsular do grupo B de *N.meningitidis*. O mecanismo de virulência associado ao antígeno K1 não está elucidado (PELCZAR *et al.*, 1981; BROOKS *et al.*, 1998; MURRAY *et al.*, 2000).

A importância da *Escherichia coli* vai muito além da sua capacidade em causar diarreia. Ela é um importante organismo indicador, porque está sempre presente na água contaminada por material fecal. É comumente mais numerosa que outros microrganismos e é mais fácil de ser isolada. A constatação de *E.coli* na água indica que outros patógenos encontrados nas fezes devem também estar presentes (BLACK, 2002).

4 - Materiais e métodos

4.1 - Área de Coleta do Material

A Enseada de Caraguatatuba, formada por várias praias, margeia grande parte da orla litorânea do município de Caraguatatuba, estendendo-se até a região norte do município de São Sebastião. Sua extensão total é da ordem de 16 Km, ao longo dos quais apresenta diferentes constituições sedimentares. Constitui uma região perturbada pela alta urbanização e por receber poluentes trazidos por dois rios, o Juqueriquerê e o Santo Antônio, que juntos despejam todo o esgoto colhido no município de Caraguatatuba. A parte sul desta enseada caracteriza-se por um estuário formado pela desembocadura do Rio Juqueriquerê, onde há formação de um manguezal e de um embaiamento, onde se constituiu uma extensa planície de marés (Mapa da região – figura 2).

A região da Enseada de Caraguatatuba possui uma alta urbanização e um grande complexo turístico, com colônias de férias, restaurantes e hotéis, bares e quiosques na orla. Esta urbanização e turismo favorecem a exploração de organismos marinhos de interesse gastronômico, como o venerídeo *Tivela mactroides* (Figura 3).

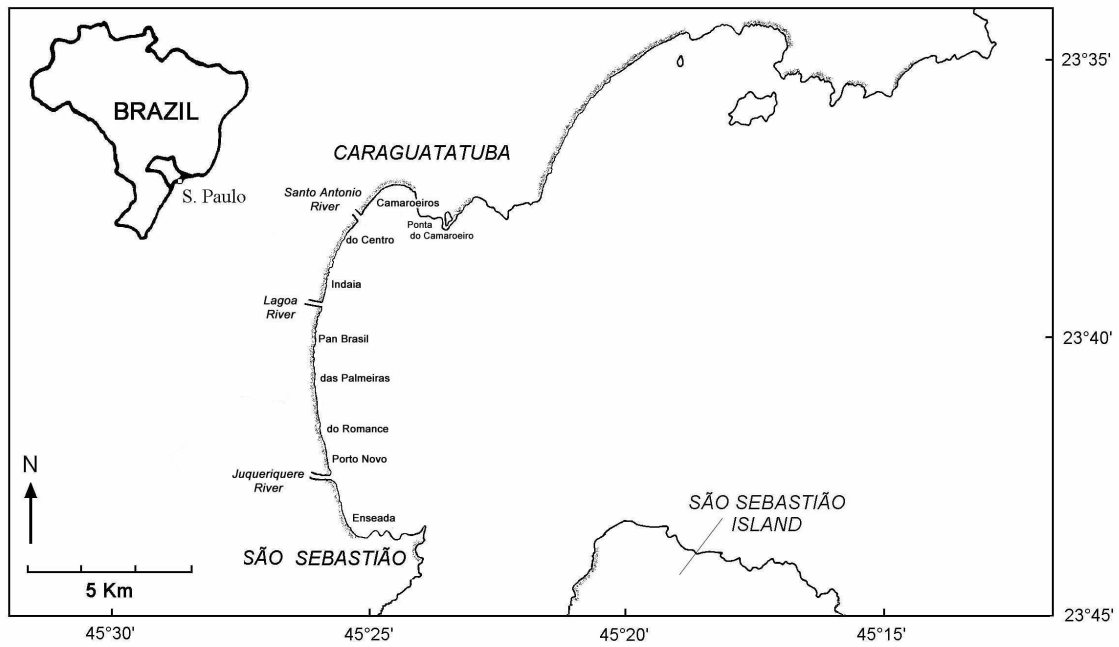


Figura 2 – Mapa da região de Caraguatatuba (fonte: Alexander Turra).



Figura 3 – Foto área de Caraguatatuba (fonte: Alexander Turra).

4.2 – Coleta das amostras de *Tivela mactroides*

O trabalho foi dividido em três experimentos com coletas nos dias 04/7 (1º), 12/7 (2º) e 18/7 (3º) com captura de 75 indivíduos em cada uma delas, sem padrão de tamanho os mesmos eram armazenados em sacos plásticos:

1º) Resfriamento imediato do material a 4°C . No total, nove amostras foram processadas a partir deste método de conservação, sendo três amostras 24h, três amostras 48h e três amostras 72h após o horário de coleta.

2º) Congelamento imediato do material a 0°C. As nove amostras congeladas foram processadas em 24h, 48h e 72h após a coleta (três amostras em cada dia para cada um dos tempos de processamento).

3º) Os indivíduos foram divididos em três amostras. Uma foi mantida *in vivo* em aquário, uma amostra foi resfriada a 4°C e a terceira amostra foi congelada a 0°C. Estas três amostras foram processadas 24h após a coleta do material.

Para a análise em laboratório e contagem de coliformes totais e coliformes fecais (*Escheria coli*) foi utilizado o método do número mais provável (NMP), segundo o Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos (2001).

Primeiramente foram preparadas as amostras e diluições seriadas, onde, por amostra, foram diluídos durante 40s em liquidificador, 25g da carne do molusco em 225ml de água peptonada a 0,1%. No caldo de enriquecimento foi desenvolvida a diluição seriada e a inoculação nos tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), chamado de teste presuntivo. Para a primeira diluição foi utilizado um tubo com 9ml de água peptonada para onde foi transferido 1ml do caldo de enriquecimento com a amostra. Logo após, foi realizada a transferência do mesmo caldo para três tubos com 6ml de LST com tubos de Durhan. O volume de caldo transferido foi de 1ml para cada tubo. Estes quatro tubos foram considerados de diluição 10^{-1} . Do tubo de água peptonada diluição 10^{-1} , transferiu-se 1ml para cada um dos três tubos, com 6ml de LST,

diluição –2 e 1ml para o tubo com 9ml de água peptonada e deste tubo era passado 1ml para os três últimos tubos de LST, sendo estes de diluição –3.

Os tubos de LST, diluição 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foram colocados em estufa incubadora a 35°C, durante 24h. Após este período era observado em quais tubos houve crescimento bacteriano com produção de gás nos tubos de Durhan. Em caso positivo (crescimento e produção de gás), era transferida uma alçada bem carregada de cada cultura para os tubos de Caldo Verde Brilhante Bile (VB), para contagem de coliformes totais e, uma alçada bem carregada de cada cultura para tubos de Caldo *Escheria Coli* (EC), para contagem de coliformes fecais. Os tubos com resultado negativo (crescimento e/ou produção de gás) eram reincubados por mais 24 horas, sendo a leitura repetida com procedimento dos passos acima citados em caso positivo de crescimento.

Para o teste confirmativo de coliformes totais, além da inoculação nos tubos de VB, os mesmos eram incubados em estufa a 35°C por 24-48h. Depois deste período foi observado e anotado em quantos tubos houve crescimento com produção de gás.

No teste confirmativo de coliformes fecais, os tubos de EC inoculados foram incubados em banho-maria a 44,5°C por 24-48h. Depois deste período foi observado e anotado em quantos houve crescimento e produção de gás. De cada tubo de EC com produção de gás foi estriada uma alçada em placas de Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB). Estas foram incubadas em estufa a 35°C por 24-48h, e após este período foi observado se houve ou não o desenvolvimento de colônias típicas de *E. coli*, caracterizadas por apresentarem núcleos com centro preto, com ou sem brilho metálico.

Esquema de análise:

1-) Em cada coleta foram capturados em média 75 indivíduos de *Tivela mactroides*, sendo todos retirados de uma mesma área. Dos 75 coletados na primeira semana que foram mantidos resfriados, 24 eram processados em cada dia, com o procedimento ocorrendo em triplicatas (8 indivíduos por análise) (Fig. 4).

O mesmo procedimento foi realizado com os indivíduos congelados, na segunda semana de análise (Fig. 5).

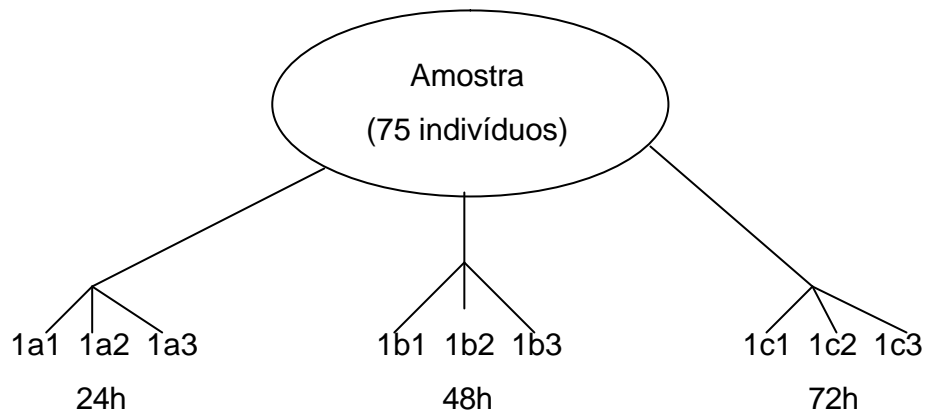


Figura 4 – Esquema de análise do material resfriado.

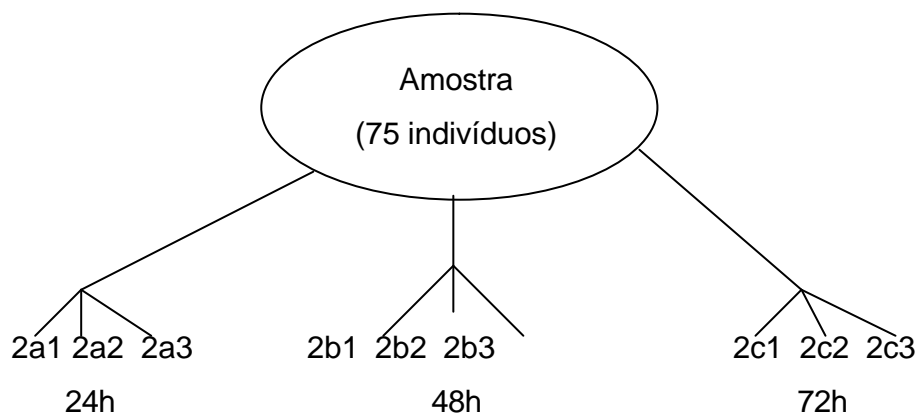


Figura 5 – Esquema de análise do material congelado.

2-) Na última semana de análise foram processadas três triplicatas de cada um dos métodos propostos, seguindo o mesmo esquema, com a diferença de que todas as amostras foram processadas após 24 horas (Fig. 6). As amostras *in vivo* serviram como comparação para os outros métodos (em NMP/g).

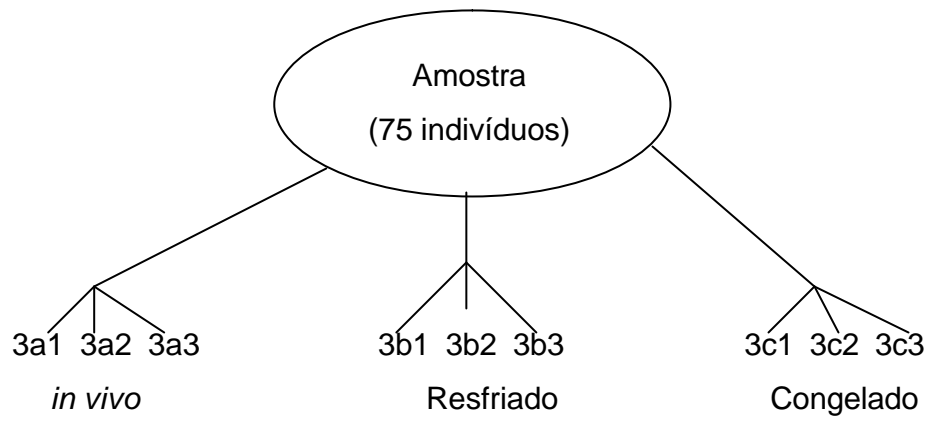


Figura 6 – Esquema de análise das amostras *in vivo*, resfriadas e congeladas.

Para análise dos resultados foi utilizado a **tabela**

5 – Resultados

As análises realizadas com as amostras mantidas resfriadas mostraram que a tendência do NMP/g de coliformes totais do molusco bivalve *Tivela mactroides* tem uma correlação com o tempo mantido conservado resfriado, ou seja, quanto mais tempo de resfriamento menor o NMP/g para coliformes totais (gráfico 1).

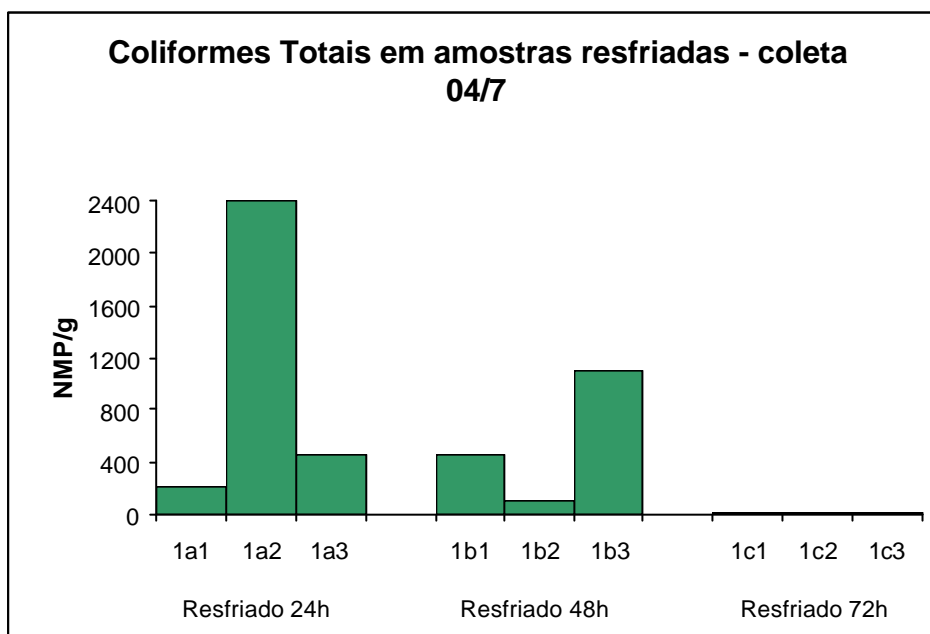


Gráfico 1: NMP/g de coliformes totais em amostras resfriadas por 24, 48 e 72 horas.

O mesmo não se confirmou, em relação aos coliformes totais, nas amostras congeladas, pois houve declínio do NMP/g em 24 horas e aumento em 72, o que indica que ocorreu crescimento bacteriano nessas 24 horas (gráfico 2).

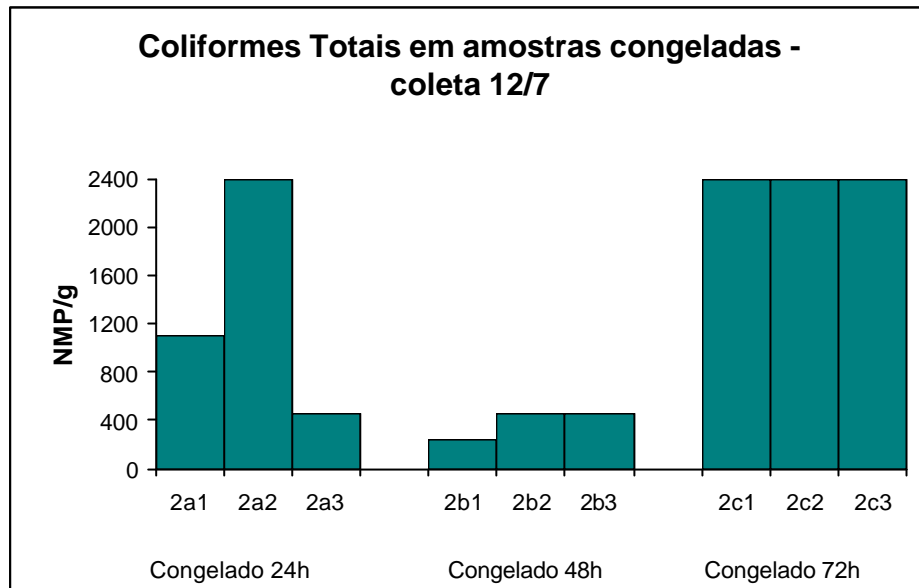


Gráfico 2: NMP/g de coliformes totais em amostras congeladas 24, 48 e 72 horas.

O método de congelamento se mostrou mais eficaz em relação à morte dos coliformes totais, pois quando comparado com o controle (*in vivo*) e com o resfriado, o seu NMP/g foi o mais baixo nas três amostras da triplicata (gráfico 3).

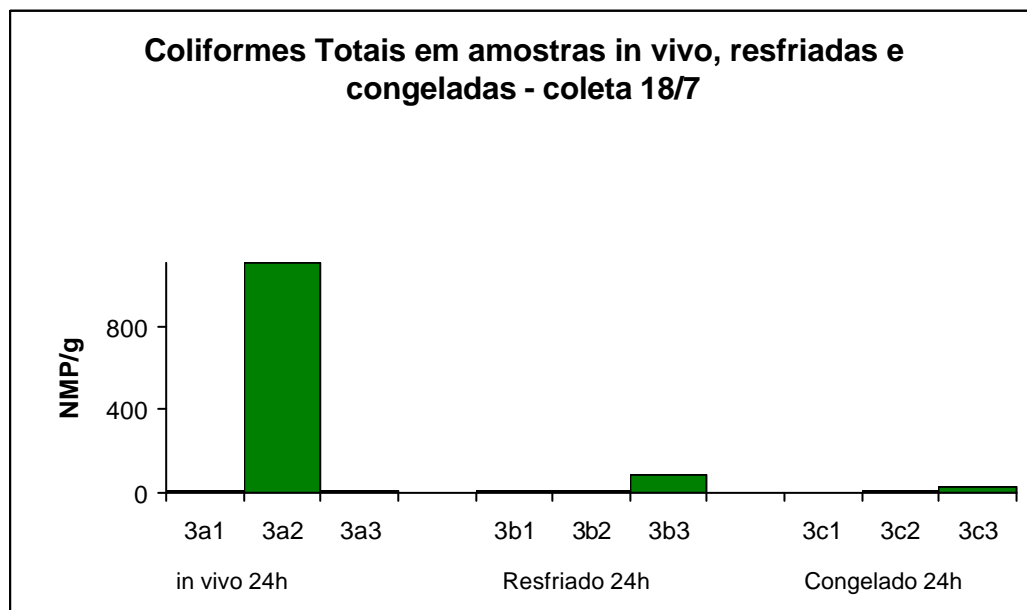


Gráfico 3: NMP/g de coliformes totais em amostras *in vivo*, resfriadas e congeladas por 24 horas.

Quando analisado o NMP/g de coliformes fecais (*Escherichia coli*) obteve-se um número mais constante e relativamente baixo, além de ter-se observado um declínio do NMP/g quanto mais tempo as amostras eram mantidas no método (gráficos 4,5 e 6). O método que mostrou maior NMP/g foram às amostras resfriadas, que obtiveram NMP/g maior que o das amostras *in vivo* (gráfico 4).

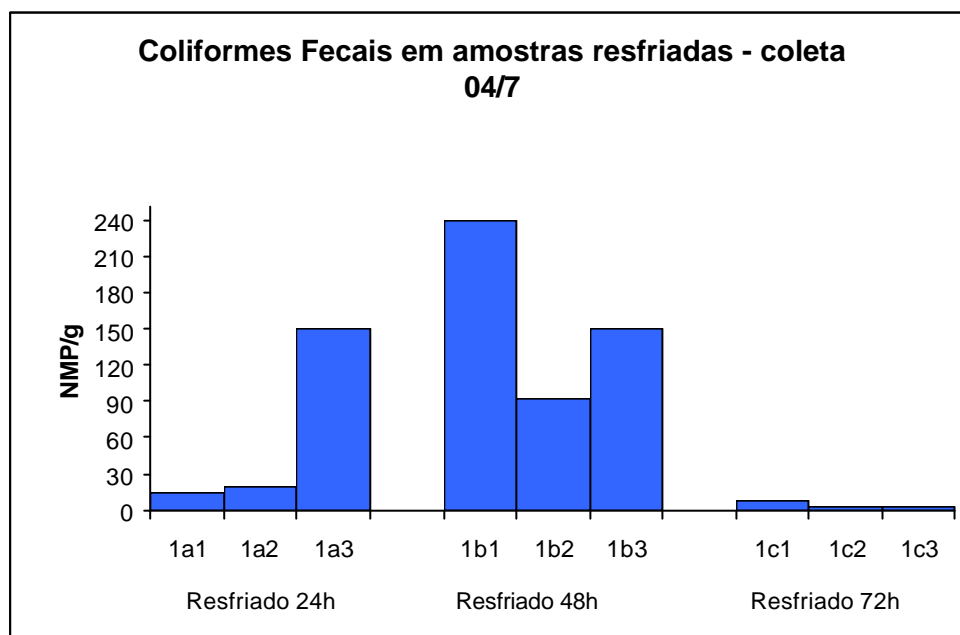


Gráfico 4: NMP/g de coliformes fecais em amostras resfriadas 24, 48 e 72 horas.

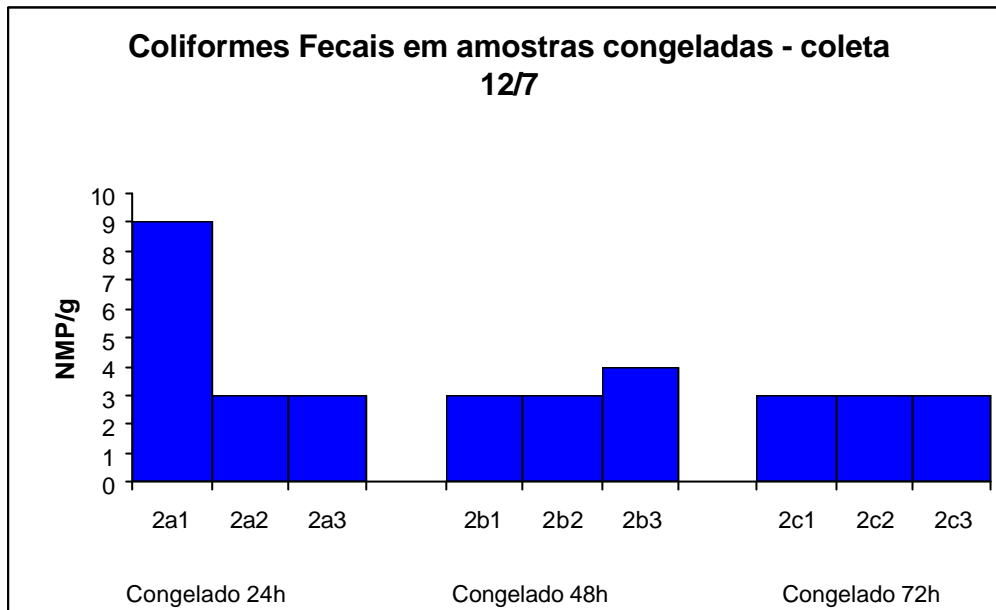


Gráfico 5: NMP/g de coliformes fecais de amostras congeladas 24, 48 e 72 horas.

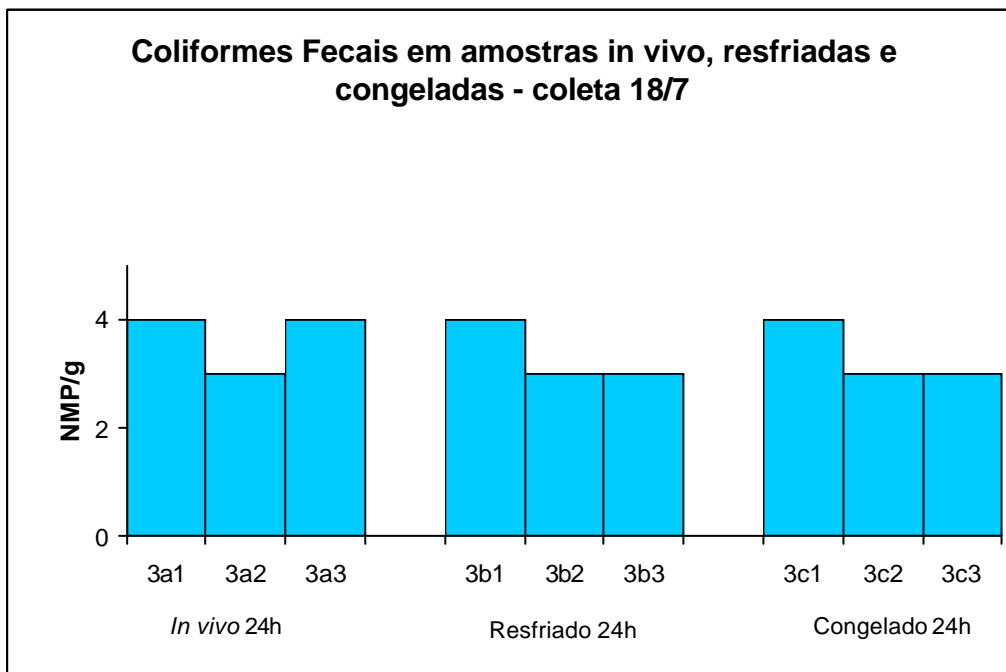


Gráfico 6: NMP/g de coliformes fecais em amostras in vivo, resfriadas e congeladas por 24 horas.

6 – Discussão e Conclusão

Com os resultados obtidos pode-se perceber que a tendência dos coliformes totais, provenientes do marisco analisado, é diminuir com temperaturas mais baixas e com maior tempo de resfriamento. Esta análise se diferenciou quando foi utilizado o método de congelamento durante três dias, que ao contrário dos outros métodos, mostrou queda do NMP/g depois de 48 horas e crescimento mesmo após 72 horas. Este fato pode ter ocorrido devido a substâncias inibitórias envolvendo as bactérias Gram-negativas, da família Enterobacteriaceae, que podem ter sido degradadas após 48 horas de congelamento. Outro fator que pode ter afetado a proliferação dos coliformes totais é uma possível interação com outros microorganismos, gerando uma competição por nutrientes ou outros fatores, presentes no intestino do molusco, necessários para o desenvolvimento dos coliformes totais.

O método que se mostrou mais eficaz para diminuição do NMP/g de coliformes totais foi o resfriado, tanto em 24, 48 ou 72 horas de conservação, pois houve declínio da quantidade de coliformes totais encontrados nestas amostras.

O NMP/g de coliformes totais foi, em média, bem maior do que o de coliformes fecais, pois o primeiro engloba o total de microorganismos Gram-negativos encontrados por amostra. Já o segundo indica a quantidade de microorganismos provenientes de fezes humanas (*Escherichia coli*), que são despejadas no mar juntamente com o esgoto.

Em relação aos coliformes fecais a tendência também foi uma diminuição com temperaturas menores e maior tempo de exposição aos métodos de conservação, porém o resultado não foi o mesmo quanto ao método mais eficaz, pois neste caso foi o método de congelamento que manteve estável e baixo o valor de NMP/g durante as 72 horas de conservação. Isto indica que *Escherichia coli* é menos resistente a baixas temperaturas, com morte bacteriana já nas primeiras 24 horas.

Em muitas das análises a temperatura não agiu só como agente microbiostático, ou seja, que provoca diminuição do metabolismo das bactérias fazendo com que não haja crescimento bacteriano, agiu nestes casos como microbicida, causando morte das células bacterianas, pois o NMP/g foi menor quanto maior o tempo de conservação.

As amostras coletadas no dia 18/07 apresentaram menor NMP/g nos três métodos comparados (*in vivo*, resfriado e congelado), tanto para coliformes totais ou fecais, indicando diminuição da carga poluente (esgoto) despejada no mar.

Foi importante ter sido realizadas triplicadas nas amostras analisadas, pois assim há como se confirmar os resultados obtidos em cada uma dessas amostras. Como exemplo temos as amostras *in vivo* de coliformes fecais nas quais apenas uma delas teve NMP/g alto, o que pode ter ocorrido por ter sido pegos indivíduos mais contaminados para realizar esta amostra. Esta metodologia diminui a margem de erro da pesquisa, tornando-se esta mais confiável.

Apesar da bactéria *Escherichia coli* ser um bom indicador de qualidade de alimento e água, analisar outros microorganismos patógenos, como *Salmonella* sp. e *Vibrio* sp., se faz necessário para que haja uma melhor descrição do nível de contaminação do molusco e com estes resultados poderemos demonstrar, através de projetos de Educação Ambiental, à população que se alimenta ou vive da pesca do *Tivela mactroides*, os perigos decorrentes da ingestão de indivíduos contaminados, além disso seria possível darmos alternativas para minimizar essa contaminação, o que foi o objetivo deste trabalho.

Pode-se concluir que o alimento analisado está próprio para consumo, pois todos eles apresentaram índices de coliformes fecais abaixo de 230 NMP/g de alimento, mesmo os resultados tendo sido positivos em todas as amostras. O único método inteiramente confiável para esterilização do molusco em relação aos coliformes é o cozimento, pois os analisados neste trabalho não mostraram tão grande eficácia, pois só diminuíram o NMP/g das amostras analisadas.

Referências Bibliográficas

Abia, 1998 In: http://www.acaq.org.br/arquivos/processamento_indust.doc site visitado em 24/09/2004.

Abbott, R.T. 1974. **American seashells**. 2a ed. New York: Van Nortrand Reinhold Company. 663 p.

Allen, M. A, 1997. **The Public Health Significance Of Bacterial Indicators In Drinking Water**. In: Coliforms and E. coli: Problem or Solution? D. Kay e C. Fricker Ed. London. p.176-181.

APHA, AWWA, WEF. 1995. **Standard Methods for the Examination of Water and wastewater**. 19a. ed.Washington.

Barnes, R.D. 1990. **Zoologia dos Invertebrados**. 4º ed.São Paulo. Editora Roca. 1029 p.

Beirão, L.H, Teixeira, E., Meinert, E.M., Santo, M.L.P.E. 2002 In:http://www.acaq.org.br/arquivos/processamento_indust.doc site visitado em 24/09/2004.

Beesley, P. L., Ross, G. J. B. e Wells, A. (eds.) 1998. **Mollusca: The southern synthesis. Fauna of Australia**. Vol. 5. CSIRO Publishing: Melbourne, part A xvi 563 pp. Part B viii. 565-1234 pp.

Born, 1778 In:http://www.acaq.org.br/arquivos/processamento_indust.doc site visitado em 24/09/2004.

Carlton, J.T., Vermeij, G.J., Lindberg, D.A., Carlton, D.A. e Dundley, E.C. 1991. The first historical extinction of a marine invertebrate in an ocean basin: the demise of the eelgrass limpet *Lottia alveus*. Biological Bulletin, 180:72-80.

Carpenter, S., Caraco, N.F., Correll, D.L., Howarth, W., Sharpley, A.N., Smith, V.H. 1998. **Nonpoint Pollution of Surface Waters with Phosphorus and Nitrogen**. Ecology Society of America. number 3. Washington.

Cerqueira, D. A & Horta, M. C. de Sá. 1998. **Coliformes fecais não existem**. Belo Horizonte/MG; UFMG – COPASA.

Charriere, G. D. ; Mossel, A, A, Beaudou e Leclerc, H. 1994. **Assessment of The Marker Value of Various Components of the coli-aerogenes group of Enterobacteriaceae and of a selection of Enterococcus spp. For the Official Monitoring of Drinking Water Supplies.** Journal of Applied Bacteriology, p. 336- 344.

Coan, E. V., Scott, P. V. e Bernard, F. R. 2000. Bivalve Seashells of Western North America. Santa Barbara Museum of Natural History, Santa Barbara, California, USA. 763 pp.

Costa, E.L., Silva, J.A. 2001. **Avaliação microbiológica da carne-de-sol elaborada com baixos teors de cloreto de sódio.** Revista Ciência Tecnologia Alimentar. Belo Horizonte. 224:56.

Cruz, I.P., Muratori, M.C.S., Lopes, J.B., Costa, A.P.R. 2003. **Escherichia coli e coliformes a 37°C no processamento de “carne-de-sol” comercializada em Teresina, Pi.** Revista Higiene Alimentar. Belo horizonte. 224:52.

Dias, J.F.B., Mesquita, E.F.M., Franco, R.M, Jesus, E.F.O., Oliveira, L.A.T.2003. **Redução da carga bacteriana da ostra nativa [Crassostrea Rhizophorae (Guilding, 1828)] in natura, resfriada e congelada, através da radiação gama.** Revista Higiene Alimentar. Belo Horizonte. 224:56.

Ducan I.B.R. 1988 - **Waterborne Klebsiella and Human Diseases. Toxicity Assessment** International Journal. 1988; 3(5):581-598.

Dupont, J., Dumont, F., Menanteau, C., Pommepuy, M. 2004. **Calibration of the impedance method for rapid quantitative estimation of Escherichia coli in live marine bivalve molluscs.** Journal of Applied Microbiology. 96:894-902.

Evans, T. M. C. E.; Waarvick, R. J. ; Seidler e LeChevallier, M. W. 1981. **Failure of The Most-Probable Number Technique to Detect coliforms in Drinking Water and Raw Water Supplies.** Applied and Environmental Microbiology. Jan. p. 130-138.

Geldreich E. E. 1997. Coliforms: A New Beginning to an Old Problem, IN: Coliforms and E. coli: Problem or Solution?. D. Kay e C. Fricker Ed. London.

Gelli, D.S. et al. 1979. **Ocorrência de Vibrio parahaemolyticus, Escherichia coli e de bactérias mesófilas em ostras.** Revista do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo. vol.39.nº1.p.61-66.

Helcias, P. *In*: www.portalbonito.com.br/colunas/helcias.asp?id=44. site visitado em 20/08/2004.

Lupin, 1999 *In*:http://www.acaq.org.br/arquivos/processamento_indust.doc. site visitado em 24/09/2004.

Mc Feters G. A. 1997. **Effects of Aquatic Environmental Stress on Enteric Bacterial Pathogens and Coliforms**, *In*: Coliforms and E. coli: Problem or Solution? D. Kay e C. Fricker Ed. London. p. 235-242.

MCLACHLAN, A., DUGAN, J. E., DEFEO, O., ANSELL, A. D., HUBBARD, D. M., JARAMILLO, E. e PENCHASZADEH, P. E., 1996, **Beach clam fisheries**, *Oceanography and Marine Biology Annual Review*, **34**, 163-232.

Migotto, A.E., Tiago,C.G. & Magalhães, A.R.M. 1993. **Malacofauna marinha da região costeira do Canal de São Sebastião, SP, Brasil: Gastropoda, Bivalvia, Polyplacophora e Scaphopoda**. *Boletim do Instituto Oceanográfico*. 41 (1-2):13-27.

Muratori, M.C.S. 1991. **Avaliação higiênico-sanitário de Curimatus ciliatus “in natura” salgado artesanalmente em Teresina, Pi**. Dissertação de mestrado, Escola de Veterinária, UFF. 116p.

Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Kobayashi,G.S., Pfaller, M.A.2000. *Microbiologia Médica*.3º ed. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro. 604p.

Cunha Neto, A., Silva, C.G.M., Stamford, T.L.M. 2002. **Staphylococcus enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no Estado de Pernambuco, Brasil**. *Ciência Tecnologia Alimentar*. Campinas. 22(3):263-271. set-dez.

Noble,R.T, Lee,I.M., Schiff,K.C. 2004. **Inactivation of indicator micro-organisms from various sources of faecal contamination in seawater an freshwater**. *Journal of Applied Microbiology*. 96:464-472.

Ogawa, M., Maia, E.L.1999. *Manual de Pesca – Ciência e Tecnologia do Pescado*. vol.1. Livraria Varela. São Paulo. 430p.

- Parker P. J.; Holt, M.; Colbourne, J. S. & Keevil, C. W. 1997. **Does Klebsiella oxytoca Grow In The Biofilm Of Water Distribution Systems?** CAMR , UK. The 1997 *In: Coliforms e E. coli: Problem or Solution?* D. Kay e C. Fricker Ed. London. p. 189-194.
- Pelczar, M., Reid, R. e Chan, E.C.S. 1981. *Microbiologia*. volu.2. Editora MacGraw-Hill do Brasil. São Paulo. 1072p.
- Pelczar Jr., M.J., Chan, E.C.S. e Krieg, N.R. 1996. *Microbiologia – Conceitos e Aplicações*. vol.1 . 2º ed. Makron Books. São Paulo. 524p.
- Rios, E. C. 1994. *Seashells of Brazil*. 2a Ed. Editora da FURG, Rio Grande. 368 pp.
- Rozen, Y., Belkin, S. 2001. **Survival of enteric bacteria in seawater**. *FEMS Microbiology Reviews*. 25:513-529.
- Santos, 1999 *In: http://www.acaq.org.br/arquivos/processamento_indust.doc*. site visitado em 24/09/2004.
- Simone, L.R.L. 1999. *Mollusca In Migotto, A.E., Tiago, C.G. Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil*. São Paulo: FAPESP. 310:129-136.
- Suwansonthichai, S. e Rengpipat, S. 2003. **Enumeration of coliforms and Escherichia coli in frozen black tiger shrimp Penaeus monodon by convention and rapid methods**. *International Journal of Food Microbiology*. 81:113-121.
- Trabulsi, L.R., Alterthum, F., Gompertz, O.F. e Candeias, J.A.N. 1999. *Microbiologia*. 3º ed. Editora Atheneu. São Paulo. 586p.
- Thomas, B. R.; Williams, S. F. & Grant, P. 1997. **Development and Evaluating of a new system for the simultaneous enumeration of Coliforms and E. coli Celsis Ltd 1997** *In: Coliforms and E. coli: Problem or Solution?* D. Kay e C. Fricker Ed. London. p. 40-48.
- Vermeij, G.J. 1986. **The biology of human-caused extinction** *In Norton, B.G. The Preservations of Species*. Princenton: Princenton University Press. p.28-49.
- Waite, W. M. 1997. **Drinking Water Quality Regulation - European Perspective**. *In: Coliforms and E. coli: Problem or Solution?* D. Kay e C. Fricker Ed. London. p. 208-217.
- Wani, S.A., Bhat, M.A., Samanta, I., Nishikawa, Y., Buchh, A.S. 2003. **Isolation and characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) from calves and lambs with diarrhoea in India**. *Letters in Applied Microbiology*. 37:121-126.

- www.condexalimentarius.com.br. site visitado em 20/09/2004.
- <http://masrv56.agricultura.gov.br/seap/index.htm>. site visitado em 21/09/2004.

