

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Dinah Antero Nicoletti

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM SOLUÇÃO HIPERCLORADA NA  
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-QUÍMICA E SOBREVIVÊNCIA DE  
OSTRAS DURANTE O PERÍODO DE ARMAZENAMENTO**

FLORIANÓPOLIS

2019

Dinah Antero Nicoletti

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM SOLUÇÃO HIPERCLORADA NA  
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA E NA SOBREVIVÊNCIA  
DE OSTRAS DURANTE O PERÍODO DE ARMAZENAMENTO**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de  
Ciências Agrárias da Universidade Federal de  
Santa Catarina como requisito para obtenção do  
Título de Bacharel em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Marília Miotto

FLORIANÓPOLIS

2019

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

Antero Nicoletti, Dinah

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM SOLUÇÃO HIPERCLORADA NA  
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA E NA  
SOBREVIVÊNCIA DE OSTRAS DURANTE O PERÍODO DE ARMAZENAMENTO  
/ Dinah Antero Nicoletti ; orientador, Marília Miotto,  
2019.

50 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agrárias, Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos,  
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2. Ostras . 3.  
Microbiologia. 4. Físico-química. 5. Vida de prateleira. I.  
Miotto, Marília . II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.  
III. Título.

Dinah Antero Nicoletti

**Influência do tratamento com solução hiperclorada na qualidade microbiológica, físico-química e sobrevivência de ostras durante o período de armazenamento.**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovado em sua forma final pelo Curso.

Florianópolis, 25 de Novembro de 2019.

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Carmen Maria Oliveira Muller.  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Marília Miotto  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Carlise Beddin Fritzen-Freire  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Isabela Maia Toaldo  
Universidade Federal de Santa Catarina

*Dedico este trabalho a minha mãe Margarida, ao meu padrasto Valdir e ao meu namorado Augusto.*

## AGRADECIMENTOS

À Prof. Dr.<sup>a</sup> Marília Miotto, pela orientação, pela paciência e dedicação em me ajudar a realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Giustino Tribuzi pela participação durante o desenvolvimento deste projeto.

Ao Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca – CEDAP/EPAGRI, parceiro deste projeto desde a sua concepção até a sua realização.

À Dr.<sup>a</sup> Natália da Costa Marchiori, pesquisadora do CEDAP/EPAGRI, pela colaboração na elaboração e execução do projeto.

À Fazenda Marinha Atlântico Sul pelo fornecimento de amostras e ao CEDAP/EPAGRI pela coleta e transporte..

À Natália e a Karin, pela amizade, pela parceria, e pela dedicação durante as análises.

Ao Adolfo pelos ensinamentos e suporte durante a pesquisa

À Nataly pela disponibilidade em ajudar no uso do microscópio.

À Nati do laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos por disponibilizar alguns materiais.

À Mariana e Samira, pela amizade e pelo apoio.

Ao Prof. Dr. Airton Kist, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela colaboração com as análises estatísticas.

Ao grupo Numical em especial Alana, Maria Luiza, Gabriela e Aline.

À Juci, Josiel e Michele pelo incentivo e ensinamentos.

Aos meus amigos Andriele, Bruna, Nathalia, Maria Eliza e Thalita, que me apoiaram e estiverem presente durante nesses 4 anos.

A turma de TCC e 15.2.

Aos membros da banca.

Ao laboratório de Bioprocessos.

Ao laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

A Universidade Federal de Santa Catarina e ao Departamento.

## RESUMO

O estado de Santa Catarina é maior produtor nacional de moluscos bivalves, sendo destaque os mexilhões, ostras e vieiras na economia do estado. Moluscos bivalves são organismos filtradores que captam seu alimento da água e pode vir acumular bactérias, toxinas e vírus presentes na água. As ostras da espécie *Crassostrea gigas* são as mais produzidas no estado e podem conter uma microbiota muito variada de bactérias deteriorantes e patogênicas. Durante o beneficiamento de ostras *in natura* é exigido pelo Plano Nacional de Controle Higiênico Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB) a lavagem com água hiperclorada (concentração de 5ppm residual), mas não fica claro se o efeito do cloro é eficaz para redução de possíveis microorganismos patogênicos. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do cloro nas ostras *C. gigas* durante o tempo de armazenamento, à  $5,0\pm 0,7^{\circ}\text{C}$ , através de ensaios microbiológicos, análises físico-químicas incluindo umidade e pH, e mortalidade das ostras. As ostras foram coletadas pelo Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca (Cedap), instituição parceira neste projeto, na baía sul de Santa Catarina na fazenda marinha Atlântico Sul, durante o mês de Setembro. As ostras foram divididas em dois grupos de amostras, o grupo que passou pelo processo com água hiperclorada e o grupo controle, e as análises foram realizadas em intervalos de tempos selecionados (0, 1, 2, 4, 6 e 8 dias), em cada tempo, 6 ostras de cada grupo era destinado aos ensaios microbiológico e 3 ostras de cada grupo para os ensaios físicos, um total de 9 ostras em cada tempo e a mortalidade eram observados nas 9 ostras selecionadas em cada grupo. Os resultados obtidos foram, ausência de *Salmonella spp* nos dois grupos de amostras, realizado no primeiro e último dia, e contagens de *E. coli* abaixo do limite de quantificação ante os dias de armazenamento. As contagens de bactéria aeróbias e halofílicas durante os 8 dias de armazenamento, estavam de acordo com alguns estudos, indicando estar em boas condições de qualidade. Observou-se crescimento de *Vibrio spp.* no 4º dia de armazenamento, e a espécie isolada foi o *V. alginolyticus* nas amostras do grupo tratadas com água hiperclorada. Durante o tempo de armazenamento as amostras do grupo com água hiperclorada e amostras do grupo controle apresentou baixa perda de água e o pH não foi evidenciado a baixo de 6, indicativo de boa qualidade. A taxa de mortalidade das amostras com água clorada foi 13% superior ao grupo controle com 11%, um achado nesse estudo, foi que o cloro pode ter apresentado alguma toxicidade sobre as ostras, entretanto é necessário mais pesquisas, com uma amostragem maior para poder avaliar este efeito. Neste estudo concluiu-se que não foi observada diferença estatística entre os dois grupos, quanto a utilização do cloro ( $p>0,05$ ) para os parâmetros microbiológicos e físico-químicos avaliados. Exceção foi observada para as contagens de bactérias psicotróficas aeróbias para as quais foram obtidas contagens menores ( $p<0,05$ ) nas amostras do grupo com água hiperclorada em relação às amostras do grupo controle, o que nos permite concluir que o tratamento com água hiperclorada influenciou nestas contagens durante os oito dias de armazenamento.

**Palavras-chave:** Ostras *Crassostrea gigas*. Água hiperclorada. Plano Nacional de Controle Higiênico Sanitário de Molusco Bivalves (PNCMB).





## ABSTRACT

The state of Santa Catarina is the major producer of bivalve mollusks, with special attention for the mussel, oyster, and scallops in the economy of the state. Bivalve mollusks are filtering organisms that can capture their food from water and can accumulate bacteria, toxins, and viruses present in water. The oysters of the *Crassostrea gigas* species are the most produced in the state and could have a very varied microbiota of spoilage and pathogenic bacteria. During the processing of fresh oysters, the National Hygienic Sanitary Control Plan (PNCMB) requires the washing with hyperchlorinated water (residual 5ppm concentration), but it is not clear whether the effect of chlorine is effective in reducing possible pathogenic microorganisms. Thus, this study aimed to evaluate the effect of chlorine on *C. gigas* oysters during storage period at  $5.5 \pm 0.7$  ° C through microbiological assays, physicochemical analysis including moisture and pH, and oyster mortality. The oysters were collected by the Center for Aquaculture and Fishing Development (Cedap) from the southern bay of Santa Catarina Island in the South Atlantic Harvest Area in the month of September. It was divided into two sample groups, the hyperchlorinated water process group, and the control group, and the analyses were performed at selected time intervals (0, 1, 2, 4, 6 and 8 days), at each time, 6 oysters from each group were used for microbiological assays and 3 oysters from each group for physical assays, a total of 9 oysters at each time and mortality was observed in the 9 oysters selected in each group. The results obtained were absence of *Salmonella* spp in both sample groups, performed on the first and last day, and low *E.coli* counts during the storage days. Aerobic and halophilic bacterial counts during the 8 days of storage agreed with some studies and good quality. Growth of *Vibrio* spp. on the 4th day of storage, and the species isolated was *V. alginolyticus* in the group samples with hyperchlorinated water. During storage time, the samples of the group with hyperchlorinated water and samples of the control group showed low water loss and pH was not evidenced below 6, indicative of good quality. The mortality rate of the chlorinated water samples was 13% higher than the 11% control group, a finding in this study was that chlorine may have shown some toxicity on oysters, however more research is needed, with a larger sampling for oysters. In this study it was concluded that no statistical difference was observed between the two groups regarding the use of chlorine ( $p > 0,05$ ) for the microbiological and physicochemical parameters evaluated. Exception was observed for the counts of aerobic psychrotrophic bacteria for which lower counts were obtained ( $p < 0,05$ ) in the samples of the group with hyperchlorinated water compared to the samples of the control group which, allows us to conclude that the treatment with hyperchlorinated water influenced these counts during the eight days of storage.

**Keywords:** Oyster *Crassostrea gigas*. Hyperchlorinated water. National Hygienic Sanitary Control Plan (PNCMB).

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Evolução da produção de moluscos comercializados em Santa Catarina entre os anos de 1900 e 2017.....	18
<b>Figura 2.</b> Contagens de mesófilos aeróbios totais nas amostras de ostras do grupo controle(Co) e as amostras que receberam o tratamento com água hiperclorada(AH), armazenadas durante oito dias à temperatura de $5,5 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$ . ....	33
<b>Figura 3.</b> Contagem de bactérias aeróbias psicrotróficas nas amostras de ostras do grupo controle(Co) e as amostras que receberam o tratamento com água hiperclorada(AH), armazenadas durante oito dias a temperatura de $5,5 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$ .....	35
<b>Figura 4.</b> Contagem de bactérias halofílicas nas amostras de ostras do grupo controle(Co) e as amostras que receberam o tratamento com água hiperclorada(AH), armazenadas durante oito dias a temperatura de $5,5 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$ .....	36

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Critérios microbiológicos estabelecidos para definição da retirada de moluscos bivalves das áreas de cultivo no Brasil.....	21
<b>Tabela 2.</b> Contagens de <i>E. coli</i> nas amostras de ostras do grupo controle (Co) e as amostras que receberam o tratamento com água hiperclorada (AH) armazenadas durante oito dias a temperatura de $5,5 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$ .....	32
<b>Tabela 3.</b> Contagem de <i>Vibrio</i> spp em Ostras ( <i>C.gigas</i> ) nas amostras de ostras do grupo controle(Co) e as amostras que receberam o tratamento com água hiperclorada(AH), armazenadas durante oito dias a temperatura de $5,5 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$ .....	37
<b>Tabela 4.</b> Teor de umidade nas amostras de ostras do grupo controle e as amostras que receberam o tratamento com água hiperclorada, armazenadas durante oito dias a temperatura de $5,5 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$ .....	38
<b>Tabela 5.</b> Valores de pH da carne nas amostras de ostras do grupo controle (Co) e as que receberam o tratamento com água hiperclorada (AH) armazenadas durante oito dias a temperatura de $5,5 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$ .....	39
<b>Tabela 6.</b> Taxa de mortalidade diária e porcentagem total das amostras de ostras do grupo controle (Co) e as amostras que receberam o tratamento com água hiperclorada (AH), armazenadas durante oito dias a temperatura de $5,5 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$ .....	41

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CIDASC - Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola

EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

NMP - Número Mais Provável

NSSP- *National Shellfish Sanitation Program*

PNCMB - Plano Nacional de Controle Higiênico-Sanitário

UFC - Unidade Formadora de Colônia

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.1.1	Objetivos Específicos.....	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
3.1	AQUICULTURA.....	17
3.1.1	Qualidade da água dos moluscos bivalves.....	19
3.1.2	Legislação.....	20
3.1.3	Ostra ( <i>Crassostrea gigas</i> ).....	22
3.1.4	Beneficiamento de ostras <i>in natura</i> .....	23
3.1.5	Vida de prateleira de ostras <i>in natura</i> .....	24
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
4.1	PREPARO DA AMOSTRA E TRATAMENTO COM ÁGUA HIPERCLORADA	26
4.2	ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS.....	27
4.2.1	Determinação de <i>Salmonella</i> spp. ....	28
4.2.2	Enumeração de <i>E. coli</i> .....	28
4.2.3	Contagem de bactérias aeróbias psicotróficas .....	28
4.2.4	Contagem total de mesófilos aeróbios .....	29
4.2.5	Contagem de bactérias halofílicas.....	29
4.2.6	Determinação de <i>Vibrio</i> spp.....	29
4.3	ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS .....	30
4.3.1	Umidade .....	30
4.3.2	pH.....	30
4.4	MORTALIDADE.....	31
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>

5.1	EFEITO DO TRATAMENTO COM ÁGUA HIPERCLORADA EM OSTRAS <i>IN NATURA</i> DURANTE O PERÍODO DE ARMAZENAMENTO .....	31
5.1.1	<b>Ensaio Microbiológico</b> .....	<b>31</b>
5.1.2	<b>Parâmetros físico-químicos e mortalidade</b> .....	<b>38</b>
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>43</b>
7	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O estado de Santa Catarina é o a maior produtor nacional de ostras e mexilhões cultivados, com destaque aos municípios localizados nas baías Norte e Sul da Ilha de Santa Catarina que representa cerca de 97% da produção estadual (SANTOS; GIUSTINA, 2018).

Ostras são organismo que se alimentam filtrando água do mar, neste processo também podem vir a acumular microrganismos, como vírus e bactérias, toxinas e outras substâncias que podem estar presentes na água. Deste modo, podem acumular uma elevada carga microbiana e representar um risco para saúde dos consumidores, se consumidas cruas ou levemente cozidas (TRIBUZI, 2013; RUBINI *et al.*, 2018).

A qualidade da água é um fator importante e determinante para a qualidade microbiológica de ostras nela cultivadas. A carga microbiana está associada a descarga continua de esgotos, escoamento de água superficiais de terras agrícolas e urbanas, atividades de navegação e animais domésticos (GARBOSSA *et al.*, 2017; SUPPLY, 2018).

O Plano Nacional de Controle de Higiêncio-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB) estabelece o critério de monitoramento microbiológico de moluscos bivalves por meio da estimativa da densidade média da bactéria *Escherichia coli* em 100 gramas da parte comestível (BRASIL, 2012).

A instrução normativa que institui o PNCMB determina que na planta processadora de moluscos bivalves deve estar prevista a utilização de equipamento adequado para hipercloração da água (5 ppm de cloro residual) utilizada na lavagem dos moluscos. Isto é, após a colheita dos animais e durante o seu período de inspeção em unidades processadoras, deve-se utilizar água hiperclorada para lavagem da matéria-prima, mas não fica claro se é uma forma de reduzir a contagem microbiana presente e poder oferecer maior segurança ao consumidor (BRASIL, 2012).

Contudo, não há até o momento estudos que evidenciem se esta prática interfere na qualidade microbiológica e físico-química dos moluscos bivalves. Sendo assim, são necessários estudos que verifiquem se a contaminação da parte externa das conchas tem ou não relação com a contaminação da parte comestível e se essa prática ainda pode ocasionar mortalidade das ostras, e/ou, diminuição da sua vida útil. Destaca-se que este trabalho é parte de um projeto concebido e em execução em parceria com o CEDAP/EPAGRI.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do tratamento com água hiperclorada na qualidade microbiológica, físico-química e mortalidade de ostras *Crassostrea gigas* durante o período de armazenamento.

#### **2.1.1 Objetivos Específicos**

- Avaliar a influência do tratamento com jato de água hiperclorada a 5 ppm na qualidade de *C. gigas* durante 8 dias de armazenamento a temperatura de  $5,5 \pm 0,7^\circ\text{C}$ .
- Realizar contagens microbiológicas nas amostras de ostras durante os 8 dias de armazenamento;
- Determinar a mortalidade das ostras e analisar os parâmetros físico-químicos durante os 8 dias de armazenamento;



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 AQUICULTURA

O termo aquicultura refere-se ao cultivo de organismos aquáticos como peixes, moluscos, crustáceos, plantas aquáticas, crocodilos, jacarés e anfíbios, podendo ser tanto continental (água doce) como marinha (água salgada) (BARNABE, 1990; FAO, 2018).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a aquicultura segue crescendo mais rápido comparado a outros setores principais de produção de alimentos. Entre as décadas de 1980 e 1990 apresentou taxas de crescimento anual de 11,3% e 10,0% (excluindo plantas aquáticas) e entre o período de 2000 e 2016 apresentou um crescimento médio anual de 5,8%. Os pescados e os produtos pesqueiros são alguns dos alimentos mais comercializados no mundo. Em 2016, cerca de 35% da produção pesqueira mundial entrou em comércio internacional em diversas formas de consumo humano ou com fins não comestíveis (FAO, 2018).

A produção mundial de aquicultura em 2016 foi de 80,0 milhões de toneladas de pescados comestíveis, 30 milhões de toneladas de plantas aquáticas, assim como 37.900 toneladas de produtos não alimentares. Do total de pescados comestíveis produzidos, 67,6% são peixes de barbatanas, 21,4% são moluscos, 9,9% são crustáceos e 1,1% são outros animais aquáticos. A China foi o maior produtor de pescado comestível cultivado no ano de 2016, seguido da Noruega, Vietnã e Tailândia. A União Europeia (UE) constitui o maior mercado único de pescados e produtos pesqueiros, seguido dos Estados Unidos e Japão, estes três mercados em 2016 representaram aproximadamente 64% do valor total de importações mundiais (FAO, 2018).

A aquicultura marinha conhecida como maricultura, envolve o cultivo de moluscos, algas, camarões e crustáceos (FAO, 2018; SOUZA, 2003). Em 2016, a produção mundial de pescado comestível procedente da maricultura foi de 28,7 milhões de toneladas, sendo predominante os moluscos bivalves com 58,8% da produção mundial. As espécies de moluscos bivalves mais comercializadas no mundo são os mexilhões, ostras e vieiras. Em 2016, a China apontou como o maior exportador de moluscos bivalves do mundo, com comercialização quase três vezes a do Chile, que figura em segundo lugar. A China apresenta um consumo nacional

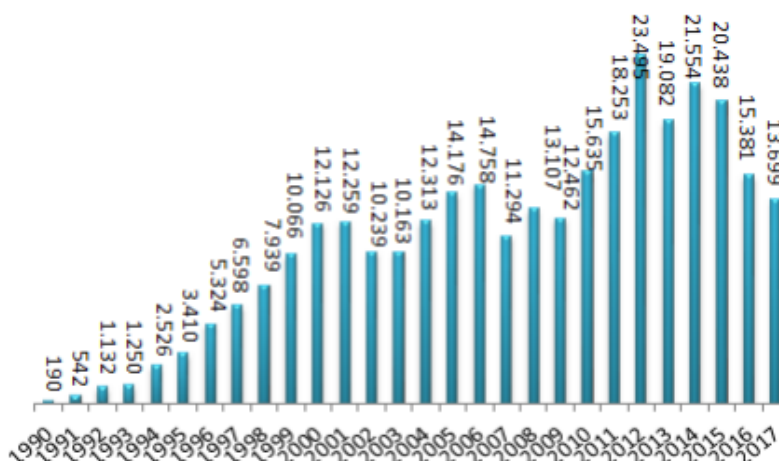
significativo, embora a União Europeia seja o maior mercado único de moluscos bivalves (FAO, 2018).

As ostras representam 97% da aquicultura mundial (EUROPEAN COMMISSION, 2013), Ostras dos gêneros *Ostione nep*, *Crassostrea* sp., foi a espécie de maior produção mundial de molusco e especificamente a *C. gigas* se encontrou em sexto colocado (FAO, 2018).

No Brasil, o estado de Santa Catarina, que apresenta um pouco mais de 1% da área total do país, é responsável por 93% da produção de moluscos bivalves. As excelentes condições geográficas desta área, como a presença de um grande número de baías, favorecem o cultivo destes organismos marinhos. Os moluscos bivalves cultivados em Santa Catarina compreendem, principalmente mexilhões (*Perna perna*), seguido por ostras (*Crassostrea gigas* e *C. rhizophorae*) e vieiras (*Lyropecten nodosus*) (EPAGRI, 2012; SANTOS; GIUSTINA, 2018; FAO, 2019).

A produção de moluscos bivalves (mexilhões, ostras e vieiras) comercializada em 2017 por Santa Catarina foi de 13.580 toneladas, representando uma redução de 11,7% em relação a 2016 (figura 1). Atuou diretamente na produção um contingente de 565 maricultores, redução de 8,6% em relação a 2016 (604 maricultores), distribuídos em 11 municípios do litoral, compreendidos entre Palhoça e São Francisco do Sul (SANTOS; GIUSTINA, 2018).

**Figura 1.** Evolução da produção de moluscos comercializados em Santa Catarina entre os anos de 1990 e 2017.



Fonte: Santos e Giustina (2018).

Os municípios que mais contribuíram para produção total de moluscos bivalves foi Palhoça (8.093 toneladas), seguido por Florianópolis (2.800 toneladas), Bombinhas (936 toneladas), São José (432 toneladas) e Penha (597 toneladas) (SANTOS; GIUSTINA, 2018).

### 3.1.1 Qualidade da água dos moluscos bivalves

Os moluscos bivalves são organismo filtradores que captam seu alimento, na água e neste processo também pode vir a acumular microrganismos, como vírus e bactérias, toxinas e outras substâncias que podem estar presentes no ambiente marinho. Deste modo, podem acumular uma carga microbiana significativa e representar um risco para saúde dos consumidores, especialmente se forem consumidos crus ou mal cozidos (RUBINI *et al.*, 2018; SUPLICY, 2018).

A qualidade da água é um fator importante e determinante para a qualidade microbiológica dos moluscos bivalves nela cultivados. Tratamento de esgoto ineficiente, escoamento de água superficiais de terras agrícolas e urbanas, atividades de navegação e animais domésticos são algumas das potenciais fontes poluidoras que podem introduzir perigos biológicos nas águas utilizadas para a maricultura (GARBOSSA *et al.*, 2017; SUPLICY, 2018).

Em relação as bactérias que podem contaminar os moluscos bivalves e que representam um grande impacto a saúde pública, pode-se citar *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Clostridium botulium*, que são bactérias encontradas naturalmente no ambiente marinho; bactérias provenientes do intestino de animais de sangue quente, indicativo de contaminação de origem fecal, dentre elas *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Shigella spp* e *Yersinia enterocolitica*. Já espécies como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Cloristridium perfringens* e *Listeria monocytogenes* podem contaminar os moluscos bivalves através de práticas inadequadas e falta de boas práticas no processamento. Em relação aos vírus, os de maior incidência em pescados são os norovirus e Hepatite A (HUSS; GRAM, 2004; FDA, 2019).

Em um estudo conduzido por Fusco *et al.* (2013) no sul da Itália, foi apontada a presença de *Escherichia coli* e norovirus nas amostras de moluscos bivalves *Mytilus galloprovincialis* e *Solen marginatus*. Estudo realizado em amostras de mexilhões coletadas ao longo da costa atlântica marroquina foi constatada a presença de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Vibrio*

*parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio cholerae* (MANNAS *et al.*, 2014). No Brasil, o estado de São Paulo relatou presença de *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva e Coliformes termotolerantes em amostras de ostras (*Crassostrea* sp. (BALLESTEROS *et al.*, 2016). No estado de Santa Catarina, ocorrência de bactérias como *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *Vibrio alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. fluvialis*, Coliformes a 45°C, *E. coli* e presença de vírus da Hepatite A, adenovírus humano, norovírus humano genogrupo I (GI) em amostras de ostras foi reportada por diferentes autores (RAMOS *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2012; RAMOS *et al.*, 2014).

Os moluscos bivalves consumidos cru ou mal cozidos, podem representar um risco significativo para a saúde pública, sendo importante medidas de monitoramento da água, tratamento de esgoto, controle sanitário para prevenir risco a saúde dos consumidores (GARBOSSA *et al.*, 2017; RUBINI *et al.*, 2018).

### 3.1.2 Legislação

Nos Estados Unidos o programa de controle sanitário de moluscos bivalves, *National Shellfish Sanitation Program* (NSSP), classifica as áreas de cultivo através contagem de coliformes a 45 °C na água, em NMP por 100mL. Durante o ano é realizado monitoramento tanto da água quanto de moluscos bivalves destinado ao consumo humano. O controle bacteriológico de moluscos bivalves é baseado na contagem de *Vibrio* spp., mais especificamente *Vibrio vulnificus* e *Vibrio parahaemolyticus* e estabelece limite máximo de 30NMP/g da carne e líquido intravalvar (NSSP, 2017).

O regulamento da União Europeia (UE) classifica a área de cultivo de moluscos bivalves em três categorias, classes A, B e C, com base na contagem do NMP de *E. coli* por 100g da carne e líquido intravalvar. Os moluscos bivalves provenientes da classe A não podem exceder o limite de 230 NMP de *E. coli* por 100g, permitido para o consumo humano direto. Em relação a classe B e C não devem exceder o limite de 46.000 NMP de *E. coli* por 100g. De acordo com a legislação pertinente, moluscos bivalves provenientes das classes B e C só podem ser comercializados após tratamento pós colheita em um centro de depuração ou afinação (UE, 2004).

Ainda na União Européia, o regulamento técnico aplicado aos gêneros alimentício, determina os critérios microbiológicos para a comercialização de moluscos bivalves vivos, de

acordo com esta normativa, moluscos bivalves devem atender os limites de 230 NMP de *E. coli* por 100 gramas e ausência de *Samonella* spp (UE, 2005).

No Brasil, a qualidade microbiológica das águas destinadas ao cultivo de moluscos bivalves para a alimentação humana segue os parâmetros estabelecidos pela Resolução nº357, março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), através da contagem de coliformes termotolerantes na água.

A amostragem necessária deve apresentar no mínimo 15 amostras coletadas no mesmo local e não deve exceder a média geométrica de 43 NMP/100mL de coliformes termotolerantes, e o percentil 90% não deverá ultrapassar 88 NMP/100mL. Esses índices deverão ser mantidos em monitoramento anual, com um mínimo de 5 amostras. (BRASIL, 2005).

O Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB), implantado através da Instrução Normativa Interministerial nº7, de 8 de maio de maio de 2012, estabelece critérios para o controle sanitário na produção e comercialização de ostras, mexilhões, vieiras e berbigões. O controle microbiológico estabelecido é a contagem do NMP de *E.coli* por 100 gramas da parte comestível dos moluscos bivalves. (BRASIL, 2012).

A portaria nº 175 de maio de 2013 definiu o plano de amostragem para o monitoramento e a definição dos critérios para retirada dos moluscos bivalves das áreas de extração ou cultivo, conforme consta no quadro 1.

**Tabela 1.** Critérios microbiológicos estabelecidos para definição da retirada de moluscos bivalves das áreas de cultivo no Brasil.

Nº amostras <230 NMP	Nº amostras 230≤ NMP≤46000	Nº amostras NMP>46000	Resultado de retirada de moluscos bivalves
=5	= 0	= 0	Liberada
=4	= 1	= 0	Liberada
=4	= 0	= 1	Suspensa
≤3	≥2	= 0	Liberada sob condição
≥4	≥1	≥1	Suspensa

FONTE: BRASIL (2013).

A Resolução-RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001, regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que determina os padrões microbiológicos para alimentos destinados ao consumo humano, estabelece para moluscos bivalves *in natura*,

contagem de estafilococos coagulase positiva até  $10^3$ UFC/g e ausência de *Salmonella* sp. em 25 gramas (ANVISA, 2001).

### 3.1.3 Ostra (*Crassostrea gigas*)

A ostra da espécie *Crassostrea gigas* (*C. gigas*), conhecida como ostra do Pacífico ou Japonesa, pertence ao filo Mollusca, classe bivalve (RUPP, 1995; GOSLING, 2001). De forma geral, a estrutura da ostra é composta por um corpo macio protegido por duas seções de conchas calcárias, unida por um ligamento do tipo dobradiça em uma das extremidades (WHEATON, 2007). A carne propriamente dita é presa em cada extremidade do músculo adutor unindo as duas valvas, controlando a abertura e fechamento das mesmas (GOSLING, 2001; WHEATON, 2007).

As valvas são compostas principalmente por carbonato de cálcio, e apresentam estrutura bastante variável. De maneira geral, a valva inferior ou esquerda é maior e mais côncava, sendo a qual, a ostra encontra fixada ao substrato, enquanto a valva superior ou valva direita é geralmente mais plana (RUPP, 1995).

A *C. gigas* é nativa na região oeste do pacífico, encontrada naturalmente no Japão, Coreia e China, entretanto cultivada em diversas regiões da Europa, América do Norte e América do Sul, apresentando boa distribuição global (IMAI, 1982 *apud* MANZONI, 2006; GOSLING, 2001; SCHMITT, 2006).

No Brasil, o cultivo de *C.gigas* foi introduzido no ano de 1974, quando as primeiras importações de semente de ostras foram realizadas, pelo Instituto de Pesquisa da Marinha em Cabo Frio/RJ (POLI, 1995). O estado de Santa Catarina deu início a pesquisa e desenvolvimento tecnológico de *C. gigas*, na década de 80 pelo departamento de aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), e o ano de 1990 representa o início da maricultura em escala comercial, tanto da produção de Ostra *C. gigas*, quanto a de mexilhão e vieiras (ANDRADE, 2016). Atualmente Santa Catarina é o maior produtor nacional de *C. gigas* e representa um forte impacto econômico para o estado (ANDRADE, 2016; SANTOS; GIUSTINA, 2018).

O cultivo de *C. gigas* consegue se desenvolver em diversos ambientes costeiros. Os fatores limitantes de sua exploração estão basicamente na tecnologia de cultivo e poluição do ambiente marinho. De forma geral, são dois sistemas de cultivo, o de fundo, que exige sistema de fundo firme, sem lodo, abrigado de correntes, ondas e baixa ocorrência de predadores, Já o

sistema de cultivo suspenso, permite cultivar grande volume de ostra, sendo a base da ostreicultura de *C. gigas*, ocupando pouca área e permite utilizar a profundidade do local, adaptando conforme as condições de profundidade, corrente, ondas e ventos fortes (SILVA, 1995).

A poluição é um fator relevante, pois são organismos que se alimentam através da filtração de algas microscópicas e material em suspensão existente na água, entretanto, em caso de descarga contínua de esgoto, pode carregar substâncias tóxicas e microrganismos patogênicos em área de cultivo, que poderão ser filtrados e concentrados, aumentando o risco de doenças relacionadas ao consumo de ostras e outros moluscos bivalves (SILVA, 1995; SOUZA; PETCOV, 2013).

#### **3.1.4 Beneficiamento de ostras *in natura***

O beneficiamento de ostras vivas, inicia com a lavagem sob água corrente potável ou água do mar limpa, sob pressão para retirada de sujidades e organismos aderidos na concha (BRASIL, 2012). De acordo com o PNCMB, deve estar prevista a utilização de equipamento adequado para hipercloração (5ppm de cloro residual livre) de água, durante a lavagem da matéria prima, mas não fica claro se o efeito do cloro é eficaz para redução de possíveis microrganismos patogênicos.

Após a lavagem, ostras provenientes de área liberada sob condição devem ser submetidas ao tratamento de depuração, que visa reduzir a contaminação microbiana aos níveis aceitáveis para o consumo humano, realizado em ambiente natural ou em centro de depuração (BRASIL, 2012; SOUZA; PETCOV, 2013). O processo de depuração em ambiente natural, consiste em levar as ostras em áreas onde a qualidade da água esteja adequada para produção, ou realizada em centros de depuração, transferindo para tanques com água do mar circulante, esterilizada com ultravioleta, cloro ou ozônio (GALVÃO; OETTERER, 2014; GYAWALI *et al*, 2019).

A depuração é praticada na Europa, Austrália e Ásia e em menor ocorrência nos Estado Unidos e demonstra ser bem sucedida na redução de bactérias indicadoras de contaminação fecal (GYAWALI *et al*, 2019). No Brasil, estudo realizado por Corrêa *et al*. (2007) no estado de Santa Catarina, avaliou um sistema comercial de depuração de irradiação UV combinado com

cloro sob a temperatura de 19°C, através da contaminação artificial com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (variou entre 15.000 a 20.000 UFC/g) em *C.gigas*, e resultou na eliminação total das bactérias em 12 horas de processo. De acordo com Souza *et al* (2014), concluíram que a depuração é uma alternativa eficiente para redução de patógenos, porém em Santa Catarina é necessário realizar mais estudos para confirmar a eficiência desse processo.

Por fim, devem ser dispostas em embalagem de forma a evitar a perda de líquido intravalvar e ser expedido o mais rápido possível para o consumidor (BRASIL, 2012). Não contém requerimento quanto aos métodos de transporte, permitindo o uso de sistema de refrigeração ou em gelo (GALVÃO; OETTERER, 2014).

### 3.1.5 Vida de prateleira de ostras *in natura*

Ostras comercializadas na forma *in natura* são perecíveis e, de forma geral, tem uma vida de prateleira muito curta (PORTELA, 2005). A vida de prateleira depende de alguns fatores como a qualidade da água, higiene durante a manipulação, condições de armazenamento e principalmente com a carga microbiana inicial (GONÇALVES, 2011; FORSYTHE, 2013).

A microbiota de ostras é basicamente dominada por psicotróficos e geralmente as bactérias isoladas são *Pseudomonas* spp., *Aleomonas* spp., *Shewanella putrefaciens*, *Acinetobacter* spp., e *Moraxella* spp., já a microbiota mesófila é formada basicamente por bactérias dos gêneros *Micrococcus* e *Acinetobacter*, bactérias deteriorantes responsáveis por causar odor e sabor desagradável, além disso, microbiota de ostras espécies dos gêneros *Staphylococcus* e *Bacillus*, bactérias ácido lácticas e bactérias das famílias *Vibrionaceae* e *Enterobacteriaceae* também podem ser isoladas de ostras (GRAM; HUSS, 1996; CAO; XUE; LIU, 2009;). As bactérias frequentemente isoladas em ostras da família *Vibrionaceae* incluem *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *Alteromonas hydrophila* (COOK; RUPLE, 1989) e em relação a família *Enterobacteriaceae* mesofílica as de maior ocorrência em pescados são *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Yersinia enterocolitica* (FDA, 2019).

A temperatura é um fator importante para o controle bacteriológico, os psicotróficos são capazes de deteriorar o alimento em temperatura de refrigeração (abaixo de 7°C) e os mesófilos se multiplicam em temperaturas elevadas (acima de 20°C). Deste modo, o sistema de refrigeração é o método de controle mais adequado para pescado, de modo a retardar a multiplicação microbiana e ação de alguns micro-organismos deteriorantes, e o armazenamento refrigerado tende a prolongar a vida de prateleira, pela diminuição da taxa de deterioração e a



vantagem de manter o frescor e a qualidade organoleptica (ASHIE; SMITH; SIMPSON, 1996; GONÇALVES, 2011; FORSYTHE, 2013).

Durante o armazenamento, podem ocorrer alterações na qualidade, multiplicação bacteriana, resultando em alteração de pH, e formação de compostos tóxicos e odores desagradáveis (FORSYTHE, 2013). Estudos observaram que em estágios mais avançados de armazenamento refrigerado de ostras (em média 4 dias), o pH diminui devido ao nível relativamente alto de glicogênio, apresentando deterioração de ostras por processo fermentativo pela ação de bactérias ácido lácticas, e ao longo do armazenamento (após 6 dias) o pH aumenta, diretamente relacionado a baixa contagem de bactérias ácido lácticas e aumento de bactérias psicrotróficas, sendo essas dominantes no processo final de deterioração (CAO; XUE; LIU, 2009; CHEN *et al.*, 2013; MADIGAN *et al.*, 2014). Pottinger (1948) concluiu que o pH é um índice de controle adequado para acompanhar o grau de frescura de ostras, observou que ostras frescas apresentaram pH de 6,2 e no momento em que o odor desagradável distinto não estava mais associado a ostra fresca, ocorreu a variação do pH entre 6,0 e 5,9, diminuindo gradualmente, tornando progressivamente mais ácida e mudando acentuadamente a aparência, mas concluiu que análise de pH não pode ser o único parâmetro para analisar o frescor de ostras.

Diferentes estudos apresentaram crescimento de bactérias psicrotróficas em ostras após 6 a 8 dias de armazenamento em sistema de refrigeração (aproximadamente  $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), sendo dominantes no final da deterioração as bactérias *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter* e *Psychromonas* e foi observado multiplicação de *Vibrio* spp., *Arcobacter*, *Vibrionaceae*, *Enterobacteriaceae* sob as mesmas condições (CAO *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2013; ; MADIGAN *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2019).

As alterações na composição microbiana de ostras e a taxa de decomposição tecidual serão influenciadas pelo número de microrganismos presentes, sendo que a mesma apresenta uma diversidade de comunidade bacteriana inicialmente alta e pode mudar de acordo com as condições de armazenamento pós colheita e dependendo da temperatura de armazenamento (FERNANDEZ-PIQUER *et al.*, 2012).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 PREPARO DA AMOSTRA E TRATAMENTO COM ÁGUA HIPERCLORADA**

Ostras da espécie *Crassostrea gigas* recém colhidas na Fazenda Marinha Atlântico Sul, Florianópolis SC, foram entregues no laboratório de Tecnologia de Pescados, do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFSC. As ostras foram coletadas pelo Centro de

Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca (Cedap), parceiro deste projeto, e transportadas até a UFSC em caixas isotérmicas fechadas contendo gelo reciclável sob temperatura de 7,5°C.

Foi coletado um total de 108 ostras, e divididas em dois grupos de 54 ostras cada. Em um dos grupos foi realizado o tratamento com água hiperclorada, sendo designado como AH na concentração de 5 ppm de cloro residual livre. A água hiperclorada foi fornecido pelo laboratório de química vinculado a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), realizado a partir de uma solução de hipoclorito de sódio de 2,5%, diluído em água de osmose reversa.

Para o tratamento com água hiperclorada, as ostras foram dispostas em bandejas com perfuração e realizou-se a aspersão da água hiperclorada sobre as ostras durante cinco minutos, sendo que na metade do tempo as outras foram viradas de posição. Neste procedimento, foi utilizado 1L de água hiperclorada, após o tratamento, aguardou-se 5 minutos para escorrer bem a água. Com o outro grupo de ostras não foi realizado este tratamento sendo denominado grupo controle (Co). As amostras foram armazenadas em câmara de refrigeração, em bandejas separadas, posicionadas com a valva inferior para baixo, cobertas com um filme plástico, sob temperatura refrigeração de  $5,5\pm 0,7^{\circ}\text{C}$ , monitorado com Datalogger (Testo, 174H).

Foram coletadas amostras de ostras no tempo zero (T0) e nos dias 1 (após 24 h de armazenamento), dia 2, 4, 6 e 8. Cada amostra era composta por nove ostras, sendo que seis ostras foram utilizadas para realizar os ensaios microbiológicos e três ostras para realizar os ensaios físico-químicos.

## 4.2 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

Em cada um dos intervalos de tempo determinados, duas amostras de ostras, sendo uma de cada tratamento foram coletadas. As ostras foram lavadas sob água corrente com auxílio de escova para remoção de sujidades externas previamente as análises. Asépticamente, as ostras foram abertas com auxílio de faca estéril e a carne juntamente com o líquido intravalvar foram transferidos para saco estéril e homogeneizados para formar um *pool*. A partir deste *pool*, foram pesados 25g para realização das diluições e condução das análises.

#### 4.2.1 Determinação de *Salmonella* spp.

Para detecção de *Salmonella* spp, seguiu-se o método *International Organization for Standardization* (ISO) 6579-1:2017 (ISO, 2017). Realizou-se pré-enriquecimento de 25g de amostra com 225g de água peptonada tamponada (APT), incubou-se a temperatura de  $35^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Após o pré-enriquecimento, transferiu-se 1 mL para o caldo Muller-Kauffmann Tetrionato-novobiocina (MKTTn) e incubou-se a  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24\pm 2$  horas, e 0,1 mL para o caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) seguido de incubação a  $42\pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $48\pm 2$  horas. Após incubação, estriou-se pelo método de esgotamento em placas de ágar Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) e Brilliant-green Phenol-red Lactose Sucrose, (BPLS), e incubou-se a  $35^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Colônias típicas de *Salmonella* spp. foram submetidas a triagem bioquímica em ágar Triple Sugar Iron (TSI), Lysine Iron Agar (LIA) e ureia ágar com sucessiva confirmação bioquímica. O resultado foi expresso como ausência ou presença de *Salmonella* spp. em 25g de amostra. A detecção de *Salmonella* spp. foi realizada no T0 e T8.

#### 4.2.2 Enumeração de *E. coli*

A enumeração de *E. coli* foi realizada de acordo com o método da ISSO 6649-3:2015, utilizando a técnica dos tubos múltiplos (ISO, 2015). A partir dos 25g de amostra, foram realizadas diluições decimais seriadas e inoculadas em série de 5 tubos de caldo glutamato mineral modificado (CGM) duplamente concentrado, seguida de duas series de 5 tubos com caldo CGM, adicionando-se em cada série de 5 tubos, 10, 1 e 0,1mL, respectivamente. Os tubos foram incubados a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24\pm 2$ h. Após a incubação, os tubos que apresentaram formação de ácidos evidenciada pela mudança de coloração de violeta para amarelo, foram estriados com auxílio de uma alça de inoculação em placa com ágar *tryptone bile glucuronide* (TBX) e incubou-se em uma temperatura de  $44\pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $22\pm 2$  horas. Após incubação, realizou-se a leitura das placas, o crescimento de colônias com tom de azul claro ou azul-esverdeado é considerado positivo para *E. coli*  $\beta$ -glucuronidase positiva. Os resultados foram expressos em NMP/100 g.

#### 4.2.3 Contagem de bactérias aeróbias psicrotróficas

Para esta análise foram utilizado o método do *American Public Health Association* (APHA, 2011). Diluições decimais seriadas foram inoculadas, através de semeadura em superfície, em ágar padrão para contagem (PCA). As placas foram incubadas a  $7\pm 1^\circ\text{C}$  durante 10 dias. Os resultados foram expressos em UFC/g.

#### **4.2.4 Contagem total de mesófilos aeróbios**

A contagem de mesófilos aeróbios foi realizada de acordo com a Norma Brasileira (NBR), 4833-1:2015 (ABNT ISO NBR, 2015). Diluições decimais seriadas foram inoculadas, através da técnica *pour plate* em placas de petry estéreis com posterior adição de aproximadamente 15 mL de ágar PCA, previamente fundido e resfriado. As placas foram incubadas a  $30\pm 1^\circ\text{C}$  por  $48\pm 2$  horas e os resultados foram expressos em UFC/g.

#### **4.2.5 Contagem de bactérias halofílicas**

Pesou-se 25g de amostras e diluiu-se (1:10) com 225g de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e realizou-se diluições decimais seriadas. Pelo método de semeadura em superfície, inoculou-se em placas contendo ágar tripticase de soja (TSA) suplementada com 2,5% NaCl. As placas foram incubadas a  $35\pm 1^\circ\text{C}$  por 48h e os resultados foram expressos em UFC/g (MUDOH *et al.*, 2014).

#### **4.2.6 Determinação de *Vibrio* spp.**

A determinação de *Vibrio* spp, seguiu a norma descrita no manual analítico Bacteriológico, do *Food and Drug Administration* (FDA) (DEPAOLA; KAYSNER, 2004). Diluições decimais seriadas foram inoculadas em série de três tubos com água peptonada alcalina (APA), suplementada com NaCl a 3%, incubando-os a  $35^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$  por 18 horas.. A partir de cada tubo com turvação, o conteúdo foi semeado em placas de ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS) que foram incubadas a  $35\pm 1^\circ\text{C}$  de 18 a 24 horas. Colônias suspeitas, com coloração amarela (sacarose-positivas), as quais podem ser tanto de *Vibrio cholerae*, como de *Vibrio alginolyticus*, quanto colônias verdes (sacarose-negativas) que podem ser tanto de

*Vibrio vulnificus*, como de *Vibrio parahaemolyticus*, foram repicadas para ágar triptona sal com 3% de NaCl (T1N3). As colônias foram submetidas ao teste da oxidase, utilizando tiras de oxidase, coloração de Gram para estudo da morfologia bacteriana. Para confirmação das espécies de *Vibrio*, os testes bioquímicos que seguem foram realizados: teste de crescimento em diferentes concentrações de NaCl (0%, 3%, 6%,8%,10%), Lactose, Arabinose, Lisina e disco de Ortonitrofenil-B-D-galactopiranosido (ONPG). O resultado foi expresso em NMP/100g.

### 4.3 ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

#### 4.3.1 Umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada conforme o método 925.09 da AOAC (2005). Amostras de  $3 \pm 0,5$ g foram colocadas em cápsula de metal, previamente taradas e pesadas em balança analítica (Marte, Modelo ATX 224). Posteriormente, as amostras foram colocadas em estufa a 105 °C, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e pesadas novamente, até atingir o peso constante. Para o cálculo do teor de umidade, realizou-se conforme a equação 1:

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{umidade ou substâncias voláteis a } 105^{\circ}\text{C porcentagem em m/m} \quad (1)$$

N= n° de gramas de umidade (perda de massa de água)

P= n° de gramas da amostra

A determinação de umidade foi realizada em triplicata e o resultado expresso com média e desvio padrão.

#### 4.3.2 pH

O pH foi medido usando pHmetro com eletrodo de penetração (HANNA, HI0530). O eletrodo foi calibrado com tampões padrão em pH 4,0 e 7,0 antes de seu uso. A determinação do pH foi realizada em triplicata e o resultado expresso como média  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.4 MORTALIDADE

Em cada tempo definido, a mortalidade foi avaliada tocando nas ostras que estavam com as valvas abertas ou semiabertas. Foram determinadas como mortas as ostras que permaneceram abertas após o toque, ou seja, nas quais não foi observado o encolhimento no manto. O resultado foi expresso em porcentagem com relação ao número de unidades totais.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi empregada análise de variância ANOVA com nível de significância de 5% ( $p=0,05$ ). One-way ANOVA foi utilizado para análise dos dados em cada grupo considerando o fator tempo. Two-way ANOVA para comparação entre os dois grupos, considerando os fatores tempo e cloro e assim poder determinar se houve diferença estatística entre os dois tratamentos. As diferenças estatísticas eram consideradas quando o  $P < 0,05$ . O programa utilizado para avaliação estatística foi o Minitab *Statistical Software*.

### 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM ÁGUA HIPERCLORADA EM OSTRAS *IN NATURA* DURANTE O PERÍODO DE ARMAZENAMENTO

##### 5.1.1 Ensaio Microbiológicos

As detecções de *Salmonella* spp. foram realizadas no dia 0 e no dia 8, nas amostras do grupo Controle (Co) e as amostras do grupo com água hiperclorada (AH). O resultado foi ausência de *Salmonella* spp. em 25 gramas de amostra, para todas as amostras realizadas,

estando de acordo com a legislação vigente, RDC nº12 de 2001, regulamentada pela ANVISA (BRASIL, 2001).

Em relação à enumeração de *E. coli* conforme consta na tabela 2, foi observado que desde as amostras do primeiro dia, as contagens de *E. coli* estavam abaixo do limite de quantificação do método menor que 1,8 NMP/100g, e mantiveram até o final dos dias de armazenamento.

**Tabela 2.** Contagens de *E. coli* nas amostras de ostras do grupo controle (Co) e as amostras que receberam o tratamento com água hiperclorada (AH) armazenadas durante oito dias a temperatura de  $5,5 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$ .

Tempo de armazenamento (dias)	NMP/100g	
	Co	AH
0	<1,8	<1,8
1	<1,8	<1,8
2	<1,8	<1,8
4	<1,8	<1,8
6	<1,8	<1,8
8	<1,8	<1,8

O monitoramento e controle microbiológico para deliberação sobre a retirada de moluscos é realizado com base na contagem de *E. coli*, de acordo com o PNCMB, implantado através da Instrução Normativa Interministerial nº 07 de 2012. De acordo com a IN 07/2012, as amostras estariam liberadas para retirada. Como não havia contaminação inicial por *E. coli* nas amostras utilizadas para este estudo, provavelmente pelas características do local de cultivo, sazonalidade e influencia do índice pluviométrico nos dias que antecederam a coleta, sugere-se que os ensaios sejam repetidos com amostras que contenham contaminação por *E. coli* para permitir a avaliar a evolução desta bactéria durante os dias de armazenamento.

*Salmonella spp.* e *E. coli* podem ser isoladas de águas tropicais, mas a principal fonte de contaminação desses organismos é a de origem fecal (HUSS; GRAM, 2004). Um estudo realizado na área costeira de Santa Catarina por Garbossa *et al.* (2017), evidenciou que as cargas microbianas indicadoras de contaminação fecal concentram-se mais em área urbanizada, sendo de menor ocorrência em bacias situadas na região sul.

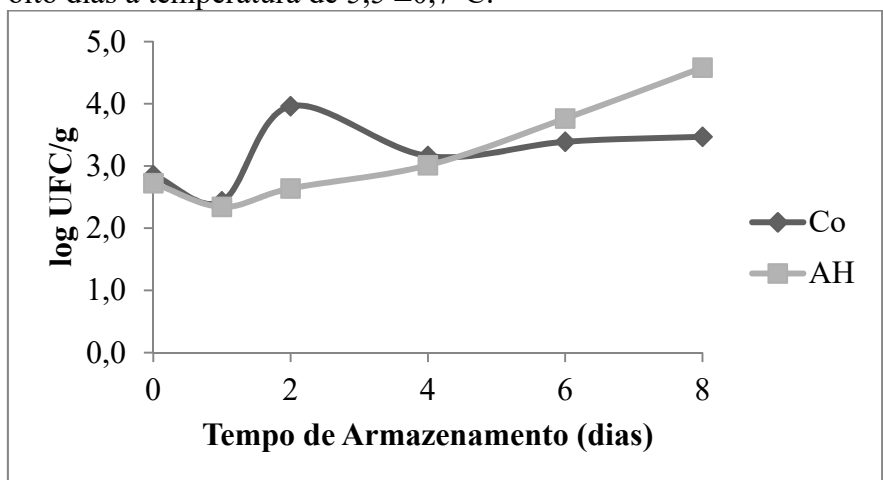
Em estudo realizado por Miotto, (2009) no qual foi realizado o monitoramento de *E. coli* em ostras e águas de cultivo na baía Sul da Ilha de Santa Catarina, concluiu que o índice pluviométrico dos setes dias anteriores a coleta bem como a qualidade da água do local de



cultivo influenciam diretamente na presença de *E. coli* nas ostras. Os resultados deste estudo corroboram com os resultados do presente trabalho.

Os resultados das contagens de mesófilos aeróbios totais são mostradas na figura 2. As amostras do grupo Co e AH apresentaram contagens iniciais de 2,9 log UFC/g e 2,7 log UFC/g, respectivamente. Observou-se, para o grupo Co, um aumento de 1 log UFC/g nas contagens quando comparado o tempo zero com as ostras após dois dias de armazenamento. Com relação ao tempo zero e o último dia de armazenamento (tempo 8), foi observado um aumento de 0,6 Log UFC/g. Para as amostras do grupo AH, observou-se redução das contagens entre o tempo zero e o dia 1 de armazenamento, e um aumento 1,86 log UFC/g ao final dos oitos dias de armazenamento. .

**Figura 2.** Contagens de mesófilos aeróbios totais nas amostras de ostras do grupo controle (Co) e as amostras que receberam o tratamento com água hiperclorada (AH), armazenadas durante oito dias à temperatura de  $5,5 \pm 0,7^\circ\text{C}$ .



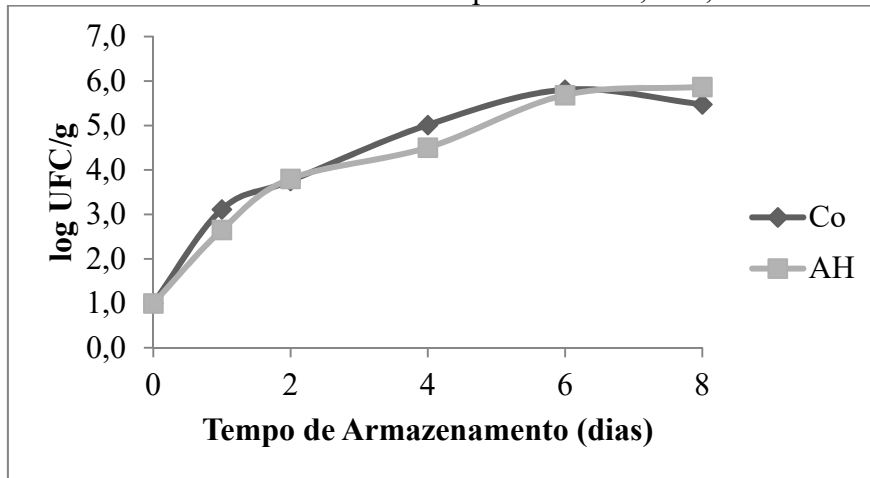
Os resultados obtidos neste estudo, em relação às contagens de mesófilos, diferem dos resultados de estudos conduzidos por outros pesquisadores nos quais as contagens iniciaram com 3,9 log UFC/g, 5,97 log UFC/g e 6,36 log UFC/g (CHEN *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2019).

As variações nas contagens de mesófilos aeróbios totais nas amostras do grupo AH e Co, apresentaram comportamento semelhante ao estudo realizado por Chen *et al.* (2013). Entretanto, não foi observada diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre as amostra do grupo Co e AH durante os oito dias de armazenamento. Sendo que, para as amostras do grupo Co, foi observada uma discrepância nas contagens de mesófilos aeróbios nas amostras coletadas no dia 2, sendo estatística maior ( $p < 0,05$ ) aos demais dias de armazenamento e em relação às contagens das amostras do grupo AH.

De acordo com Kim, Paik e Lee, (2002), o limite de qualidade aceitável para contagem de mesófilos aeróbios totais para ostras, deve apresentar no máximo 7 log UFC/g, dessa forma, as amostras do grupo AH e Co estavam dentro do limite recomendado até o último de armazenamento.

Em relação a contagem de bactérias aeróbias psicrotróficas, observou-se que, tanto para as amostras do grupo Co quanto para as amostras do grupo AH, as contagens iniciaram em 1 log UFC/g. A diferença na contagem nas amostras do grupo C e AH, entre o tempo 0 e o último dia armazenamento foi de 4,47 Log UFC/g e 4,87 Log UFC/g, respectivamente (figura 3).

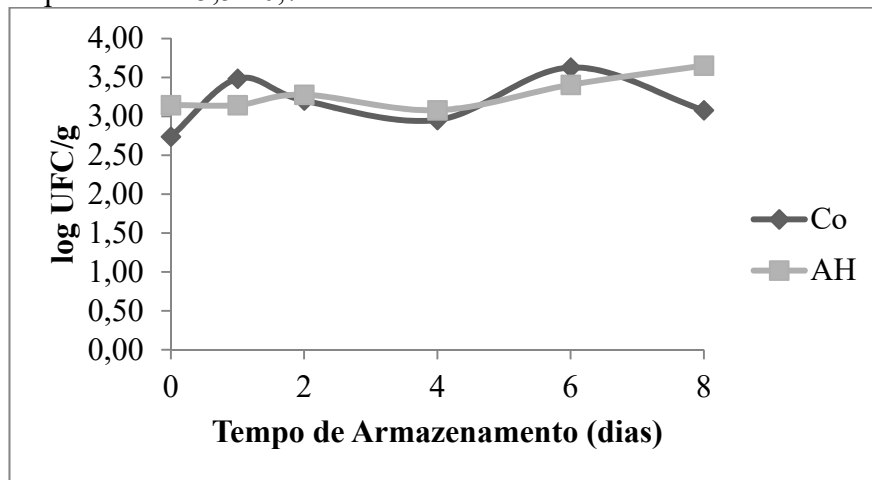
**Figura 3.** Contagem de bactérias aeróbias psicrotróficas nas amostras de ostras do grupo controle (Co) e as amostras que receberam o tratamento com água hipoclorada (AH), armazenadas durante oito dias a temperatura de  $5,5 \pm 0,7^\circ\text{C}$ .



O aumento na contagem de bactérias psicrotróficas neste estudo foi semelhante com os estudos realizados por Chen *et al.* (2017) e Chen *et al.* (2019) com ostras desconchadas. Durante o período de armazenamento, as contagens nas amostras do grupo AH foi estatisticamente menor ( $p < 0,05$ ) em relação às amostras do grupo Co durante os 8 dias armazenamento, dessa forma, pode-se observar que o cloro apontou um efeito limitante na multiplicação das bactérias psicrotróficas aeróbias.

As contagens de bactérias halofílicas observadas para os grupos Co e AH no tempo zero foram 2,74 UFC/g e 3,15 log UFC/g, respectivamente, conforme pode ser observado na figura 4. Para o grupo AH, entre o tempo zero e o último dia de armazenamento, foi observado um aumento de 0,51 log UFC/g nas contagens, sendo superior ao grupo Co, que apresentou um aumento de 0,34 log UFC/g em relação ao tempo zero.

**Figura 4.** Contagem de bactérias halofílicas nas amostras de ostras do grupo controle (Co) e as amostras que receberam o tratamento com água hiperclorada (AH), armazenadas durante oito dias a temperatura de  $5,5 \pm 0,7^\circ\text{C}$ .



As amostras do grupo AH apresentou um aumento inicial entre os dias 0 e 1, e redução nas contagem nos dias 2 e 4, semelhante aos resultados do estudo realizado por Mudoh *et al.* (2014) para contagem de bactérias halofílicas em ostras armazenadas a  $5^\circ\text{C}$  por um período de 10 dias, que explicaram que a baixa contagem poderia ter sido ocasionada por causa das bactérias competidoras por nutriente, e as células que sobreviveram voltaram a se multiplicar. Entretanto, não foi observada diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre as contagens de bactérias halofílicas para as amostras dos grupos AH e Co durante 8 dias de armazenamento, demonstrando que o tratamento com água hiperclorada não interferiu neste parâmetro.

Com relação à contagem de *Vibrio* spp. conforme resultados constado na tabela 3, somente o grupo AH apresentou contaminação, e a espécie isolada foi *V. alginolyticus*, com uma contagem de 3,0 NMP/g no quarto dia de armazenamento. No Brasil não tem regulamento em relação à contagem de *Vibrio* spp. para moluscos bivalves, mas de acordo com o guia de controle de moluscos bivalves dos Estados Unidos, esta contagem é inferior a contagem recomendada (NSSP, 2017).

**Tabela 3.** Contagem de *Vibrio* spp. em Ostras (*C.gigas*) nas amostras de ostras do grupo controle (Co) e as amostras que receberam o tratamento com água hipoclorada (AH), armazenadas durante oito dias a temperatura de  $5,5 \pm 0,7^\circ\text{C}$ .

Tempo de armazenamento (dias)	NMP/g	
	Co	AH
0	<3,0	<3,0
1	<3,0	<3,0
2	<3,0	<3,0
4	<3,0	3,0
6	<3,0	<3,0
8	<3,0	<3,0

As contagens de *Vibrio* spp. em ostras está relacionado por alguns fatores, pela temperatura da água do mar, principalmente nas estações de primavera e verão que a temperatura da água fica em torno de  $24,3^\circ\text{C}$  (RAMOS, 2012). A coleta das ostras neste estudo foi realizada na primavera durante o mês de setembro nas quais a temperatura da água do mar estava sob uma temperatura de  $17,5^\circ\text{C}$ , abaixo da temperatura adequada para o crescimento de *Vibrio* spp., e de acordo com Silva (2016) a contagem de *Vibrio* spp. em ambiente costeiro, é raramente detectado em temperaturas abaixo de  $15^\circ\text{C}$ .

As contagens de *Vibrio* spp. em ostras também são influenciadas pela salinidade da água do local de cultivo, a salinidade das águas da baía sul da ilha de Santa Catarina variam em torno de  $30,1 \pm 4,6$  ppm (RAMOS, 2012), sendo adequadas para espécies de *Vibrios* spp., entretanto, nos Estados Unidos onde as contagens e a incidência de *Vibrio* spp. nas ostras são maiores, os valores de salinidade são menores que os observados no Brasil. Ramos *et al.* (2014) relatou que a incidência de *Vibrio* spp. em ostras é inversamente proporcional a salinidade da água.

Estudo realizado por Ramos *et al.* (2012), avaliou a contaminação de ostras *C.gigas* nas regiões da baía sul de Santa Catarina, e foi detectado diferentes espécies de *Vibrio* spp., sendo que o *V.alginolyticus* foi a espécie mais isolada seguido de *V.parahaemolyticus*, *V.vulnificus* e *V.cholerae*. Outro estudo realizado por Ramos *et al.* (2014), avaliou 60 amostras de ostras da espécie *C. gigas* na mesma região, e o resultado foi de 48,3% de *Vibrio* spp., sendo que 6,7% eram isolados da espécie *V.alginolyticus*.

Já foi evidenciado em alguns estudos que a contagem total de *Vibrio* em amostras de ostras *in natura* armazenadas em baixas temperaturas, pode suprimir o crescimento total de *Vibrio* (LORCA *et al.*, 2011; MUDOH *et al.*, 2014). O guia de controle de moluscos bivalves dos Estados Unidos estabelece que devem ser armazenados em temperatura de 7,2°C, o suficiente para manter temperatura interna de 10°C, no controle de *Vibrio* spp., mais especificamente *V.parahaemolyticus* e *V.vulnificus* (NSSP, 2017).

Neste estudo as condições de armazenamento estavam de acordo com o guia de controle de moluscos bivalve dos Estados Unidos, e foi possível isolar *V.alginolyticus* após 4 dias de armazenamento em temperaturas de 5±,7°C. No Brasil não há exigências referentes a limite de temperatura de armazenamento, vale pena ressaltar que é um parâmetro muito importante na conservação de ostras *in natura* e inibir o crescimento de diferentes espécies de *Vibrio* spp.

### 5.1.2 Parâmetros físico-químicos e mortalidade

Os resultados de umidade são mostrados na tabela 4 e estão expressos como média ± desvio padrão. Observa-se que o valor de umidade obtido no dia 1, para as amostras de ostras do grupo Co, é estatisticamente maior comparado aos dias 0, 2, 4, 6 e 8 (p<0,05), mas ao decorrer do armazenamento não apresentou diferença estatística. Durante os dias de armazenamento as amostras do grupo AH não apresentaram diferença estatística nos valores de umidade (p>0,05).

**Tabela 4.** Teor de umidade nas amostras de ostras do grupo controle e as amostras que receberam o tratamento com água hipoclorada, armazenadas durante oito dias a temperatura de 5,5 ±0,7°C.

---

**Umidade(%) ± DP**

---

Tempo de armazenamento (dias)	Co	AH
0	75,96 ± 1,91 <sup>a</sup>	76,20 ± 1,99 <sup>a</sup>
1	82,10 ± 2,43 <sup>ab</sup>	87,03 ± 7,69 <sup>a</sup>
2	79,90 ± 4,45 <sup>a</sup>	78,19 ± 4,05 <sup>a</sup>
4	77,98 ± 2,34 <sup>a</sup>	77,59 ± 1,66 <sup>a</sup>
6	76,74 ± 4,31 <sup>a</sup>	79,79 ± 0,78 <sup>a</sup>
8	75,05 ± 1,69 <sup>a</sup>	75,51 ± 4,09 <sup>a</sup>

DP=desvio padrão. Os valores que apresentam a mesma letra não diferem estatisticamente a um nível de significância de 5% pelo teste de ANOVA.

Para a determinação de umidade não foi observada diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os dois grupos, desta forma conclui-se que o tratamento com cloro não interfere neste parâmetro. De modo geral, as amostras apresentaram baixa perda de água, mantendo o parâmetro químico majoritário com porcentagem próximo do resultado obtido nas amostras do tempo zero.

Os valores de pH da carne nas amostras de ostras são mostrados na tabela 5. O valor inicial do pH das amostras do grupo Co e AH foram de  $6,37 \pm 0,18$  e  $6,54 \pm 0,03$ , respectivamente, sendo que nos dois grupos o pH diminuiu entre os dias 0 e 3, semelhante aos resultados do estudo de MUDOH *et al.* (2014) com ostras *in natura* armazenadas à temperatura de 5°C.

**Tabela 5.** Valores de pH da carne nas amostras de ostras do grupo controle (Co) e as que receberam o tratamento com água hipercloreada (AH) armazenadas durante oito dias a temperatura de  $5,5 \pm 0,7^\circ\text{C}$ .

Tempo de armazenamento (dias)	pH±DP
-------------------------------	-------

	Co	AH
<b>0</b>	6,37 ± 0,18 <sup>a</sup>	6,54 ± 0,03 <sup>a</sup>
<b>1</b>	6,25 ± 0,04 <sup>ab</sup>	6,23 ± 0,21 <sup>a</sup>
<b>2</b>	6,28 ± 0,09 <sup>ab</sup>	6,18 ± 0,15 <sup>ab</sup>
<b>4</b>	6,46 ± 0,12 <sup>a</sup>	6,38 ± 0,05 <sup>a</sup>
<b>6</b>	6,30 ± 0,19 <sup>a</sup>	6,46 ± 0,09 <sup>a</sup>
<b>8</b>	6,40 ± 0,08 <sup>a</sup>	6,34 ± 0,21 <sup>a</sup>

Note: DP=desvio padrão. Os valores que apresentam a mesma letra não diferem estatisticamente a um nível de significância de 5% pelo teste de ANOVA.

Para as amostras do grupo Co, foi observado uma redução estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) nos dias 1 e 2 em relação ao tempo 0, e nos demais dias de armazenamento não foi observado diferença estatística significativa na redução e aumento de pH ( $p > 0,05$ ). As amostras do grupo AH apresentaram uma redução estatisticamente significativa no dia 2 em relação aos dias 0, 4, 6, e 8 ( $p < 0,05$ ). A diminuição do pH pode estar relacionada ao alto nível de glicogênio presente em ostras, iniciando o processo fermentativo por bactérias ácido láticas, tornando assim o meio ácido, sendo que, a forma inicial de deterioração de ostras é parcialmente fermentativa (CAO; XUE; LIU, 2009).

Ao comparar os valores de pH entre os dois grupos durante os 8 dias de armazenamento a temperatura de  $5,5 \pm 0,7^\circ\text{C}$ , não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ), desta forma, conclui-se que o cloro não produziu efeito na variação de pH. Comparado as amostras do grupo Co, o grupo AH apresentou menor valor de pH de  $6,18 \pm 0,15$  no 2º dia de armazenamento á  $5^\circ\text{C}$ , sendo que esta redução pode estar relacionada com a ação de bactérias fermentativas.

Em estudo realizado por Pottinger (1948), concluiu que o pH é um bom índice de qualidade para analisar o grau de frescor das ostras, indicando um odor desagradável em pH entre 6,0 e 5,9. Neste estudo as ostras estavam em boas condições sensoriais, tanto nas amostras do grupo Co e as amostras do grupo AH, uma vez que os valores de pH observado não foram inferiores a  $6,18 \pm 0,15$ , indicando pouca perda de qualidade durante o tempo de armazenamento.

Os níveis de mortalidade das amostras do grupo Co e AH, variaram de 11 a 44%, a partir de uma amostragem de 9 ostras coletadas em cada grupo durante 8 dias de armazenamento. Conforme mostra a tabela 6, de 9 ostras coletadas em cada grupo de amostra, no último dia de armazenamento apresentou uma perda de 44%, isso reflete a 7% do total em ambas as amostras. As amostras do grupo Co apresentou mortalidade total de 11%, inferior ao



grupo AH (13%), sendo que mais da metade foi constatado no último dia de armazenamento nos dois grupos de amostra.

**Tabela 6.** Taxa de mortalidade diária e porcentagem total, das amostras de ostras do grupo controle (Co) e as amostras que receberam o tratamento com água hipoclorada (AH), armazenadas durante oito dias a temperatura de  $5,5 \pm 0,7^\circ\text{C}$ .

Tempo de armazenamento (dias)	Co		AH	
	nºostras	%	nºostra	%
0	1	11%	1	11%
1	-	-	-	-
2	1	11%	-	-
4	-	-	-	-
6	-	-	2	22%
8	4	44%	4	44%
<b>Total</b>	<b>11%</b>	<b>-</b>	<b>13%</b>	<b>-</b>

Note: nº ostras: número de ostras mortas diariamente, através da amostragem de 9 ostras de cada grupo, coletado nos tempos selecionados.

Estudo realizado por Su, Yang e Hase (2010), avaliou a mortalidade durante o tempo de armazenamento de ostras não depuradas e ostras após tratamento em sistema de depuração refrigerado, e apresentou resultados semelhantes durante 7 dias de armazenamento, e de acordo com os seus resultados obtidos, o estudo concluiu que a refrigeração não tem efeito sobre a mortalidade, e que esta pode estar relacionada com a falta de nutrientes. Observa-se que os resultados apresentados no grupo AH, podem estar relacionados ao efeito do cloro, apresentando alguma toxicidade sobre as ostras, entretanto mais estudos devem ser conduzidos para poder afirmar esta suposição.

A temperatura é um fator importante na conservação de ostras *in natura*, mantendo durante os dias de armazenamento em uma temperatura média de  $5,5 \pm 0,7^\circ\text{C}$  com umidade relativa de  $83,48 \pm 4,96\%$ . Durante o tempo de armazenamento os ensaios físico-químicos e microbiológicos revelaram boas condições de qualidade, considerando parâmetros descritos na literatura.

Entretanto, estudos complementares necessitam ser feitos, especialmente com ostras que tenham contaminação inicial com *E. coli* para poder avaliar a evolução deste parâmetro durante o período de armazenamento. Ainda, este estudo configura-se como um estudo piloto e o

primeiro a ser realizado no Brasil, em parceria com o CEDAP/EPAGRI, para avaliar a influência do tratamento com água hiperclorada nas características do produto. Os resultados obtidos com as análises microbiológicas e físico-químicas não apresentaram diferença estatística, entre o tratamento com água hiperclorada e as amostras do grupo controle ( $p > 0,05$ ), com exceção para a contagem de bactéria psicotróficas aeróbias, para as quais as amostras do grupo AH obtiveram resultados estatisticamente menores em relação as amostras do grupo Co ( $p < 0,05$ ). De todo modo, este experimento deve ser repetido, incluindo triplicata das amostras, para permitir um tratamento estatístico mais adequado e a determinação de forma mais precisa sobre a influência do cloro nas amostras durante o período de armazenamento.

Estudo realizado por Chen *et al.* (2017) com ostras desconchadas armazenadas em embalagens com atmosfera modificada, o fator limitante na qualidade deste produto, foi o crescimento de bactérias ácido lácticas, que resultou na diminuição do pH e dos parâmetros sensoriais. De acordo com Cao, Xue e Liu (2009), foi observado um prazo de validade de 8 a 9 dias para ostras desconchadas armazenadas em temperatura de refrigeração de  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ , foi determinada pela alta contagem de bactérias aeróbias, ultrapassando o valor de 7 log UFC/g. Neste estudo não foi possível avaliar com precisão o efeito do cloro na extensão de vida de prateleira, pois as ostras dos dois grupos apresentaram condições aceitáveis, sugere-se, desta forma, prolongar os dias de armazenamento, em torno de 10 a 12 dias.

A vida de prateleira de ostras *in natura* depende de alguns fatores, da carga microbiana inicial presente na microbiota de ostras, níveis de poluição no ambiente costeira, além das condições climáticas. Para se estimar a vida de prateleira é recomendado que se leve em consideração outros atributos como textura, bases voláteis totais e a análise sensorial.

## 6 CONCLUSÃO

As amostras de ostras coletada na baía sul de Santa Catarina estavam em boas condições de qualidade microbiológica, apresentaram uma microbiota inicial com baixa contagem de mesófilos aeróbios totais, psicrotróficos aeróbios, bactérias halofílicas, *E.coli*, *Vibrio* spp. e ausência de *Salmonella* spp. Também foi observado que as amostras de ostras do grupo com água hiperclorada e as amostras do grupo controle, apresentaram boa qualidade microbiológica e físico-química durante os 8 dias de armazenamento a temperatura de  $5,5 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$ . No entanto observou-se um isolado de *Vibrio* spp. da espécie de *V.alginolyticus*, nas amostras de ostras com água hiperclorada, após 4 dias de armazenamento, mas esta de acordo com o limite recomendado pelo guia de controle de moluscos bivalves dos Estados Unidos.

De modo geral, a taxa de mortalidade foi baixa, no entanto as amostras do grupo com água hiperclorada apresentaram taxa de mortalidade superior às amostras do grupo controle, mas de todo modo os resultados apresentados não foi possível concluir se o cloro apresentou

algum efeito tóxico sobre as ostras, seriam necessários mais estudos para analisar essa suposição.

Com base nos parâmetros avaliados neste estudo, conclui-se que as amostras do grupo tratadas com água hiperclorada não apresentaram diferença estatística ( $p > 0,05$ ) em relação ao grupo controle, com exceção para as contagens de bactérias psicrófilas aeróbias durante os 8 dias de armazenamento, em que as amostras do grupo AH apresentaram resultados estatisticamente menores em relação ao grupo Co ( $p < 0,05$ ). Sugere-se repetições deste estudo, incluindo amostras em triplicata para permitir obter resultados mais precisos sobre a influência do cloro nas ostras durante o período de armazenamento. Adicionalmente, é importante a condução de estudos complementares sobre o efeito de tempo e temperatura na multiplicação de *E. coli* durante o período de armazenamento, uma vez que é este o parâmetro microbiológico regulado na legislação Brasileira.

Destaca-se a importância deste problema, pelos aspectos já citados, e pela parceria entre UFSC e CEDAP/EPAGRI.

## 7 REFERÊNCIAS

ABNT NBR ISO 4833-1:2015. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Microbiologia da cadeia produtiva de alimentos - Método horizontal para a enumeração de microrganismos. Parte 1: Contagem de colônias a 30 ° C pela técnica de pour plate.** In: Internacional Organization for Standardization (ISO), 2015.

ANDRADE, G. J. P. O. Maricultura em Santa Catarina: a cadeia produtiva gerada pelo esforço coordenado de pesquisa, extensão e desenvolvimento tecnológico. **Revista Eletrônica de Extensão**, v. 13, n. 24, p.204-217, 2016.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada-RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. A Agência Nacional de Vigilância dispõe sobre regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil União**. 2001.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 17th ed. Virginia, 2000.

ASHIE, I. N. A.; SMITH, J. P.; SIMPSON, B. K. Spoilage and Shelf-Life Extension of Fresh Fish and Shellfish. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 36, n1-2, p. 87-121, 1996.

BALLESTEROS, E. R.; ANDRADE V. C.; BARBIERI, E.; PINTO, A. B.; OLIVEIRA, R. S. OLIVEIRA, A. J. F. C. Qualidade microbiológica de ostras (*Crassostrea* sp) e de águas

coletadas em cultivos e em bancos naturais de Cananéia (SP). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, n. 1, p. 134-144, 2016.

BARNABE, G. **Aquaculture**. New York: E. Horwood, 1990.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 7 de 08 de maio de 2012. Institui o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil União**, Brasília, 09 mai. 2012b. Disponível em: <[http://www.cidasc.sc.gov.br/defesasanimariaanimal/files/2012/09/Instru%C3%A7%C3%A3o-Normativa-Interministerial-n-7-\\_Institui-o-Progr1.pdf](http://www.cidasc.sc.gov.br/defesasanimariaanimal/files/2012/09/Instru%C3%A7%C3%A3o-Normativa-Interministerial-n-7-_Institui-o-Progr1.pdf)> Acesso em: 22 ago. 2019.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Portaria nº175, de 15 de maio de 2013. **Diário Oficial [da] Federativa do Brasil União**, Brasília, 16 mai. 2013. Seção 1, p57. Disponível em: <<http://www.cidasc.sc.gov.br/defesasanimariaanimal/files/2012/09/PORTARIAN%C2%B0-175-DE-15-DE-MAIO-DE-2013.pdf>>. Acesso em: 22 set 2019.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões. **DOU, Brasília, 18 mar. 2005.**

CAO, R.; XUE, C-H.; LIU, Q. Changes in microbial flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during refrigerated storage and its shelf-life extension by chitosan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, n. 2–3, p. 272-276, 2009.

CAO, R.; XUE, C-H.; LIU, Q.; XUE, Y. Microbiological, Chemical, and Sensory Assessment of Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*) Stored at Different Temperatures. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 27, n. 2, p. 102-108, 2009.

CHEN, H.; LIU, Z.; MEIVING, W.; CHEN, S.; CHEN, T. Characterisation of the spoilage bacterial microbiota in oyster gills during storage at different temperatures. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 15, p. 3748-3754, 2013.

CHEN, H.; WANG, M.; LIN, S.; SHI, C.; LIU, Z. Bacterial microbiota profile in gills of modified atmosphere-packaged oysters stored at 4 °C. **Food Microbiology**, v. 61, p. 58-65, 2017.

CHEN, H.; WANG, M.; YANG, C.; WAN, X.; DING, H.H.; SHI, Y.; ZHAO, C. Bacterial spoilage profiles in the gills of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) and Eastern oysters (*C. virginica*) during refrigerated storage. **Food Microbiology**, v. 82, p. 209-217, 2019.

COOK, D. W.; RUPLE, A. D. Indicator Bacteria and *Vibrionaceae* Multiplication in Post-Harvest Shellstock Oysters. **Journal of Food Protection**, v. 52, n. 5, p. 343-349, 1989.

CORRÊA, A. A.; ALBARNAZ, J. D.; MORESCO, V.; POLI, C. R.; TEIXEIRA, A. L.; SIMÕES, C. M. O.; CÉLIA, R. M. B. Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Marine Environmental Research**, v. 63, n. 5, p 479-489, 2007.

DEPAOLA A. J.; KAYSNER.C.A. **Bacteriological Analytical Manual *Vibrio***. In: Food and Drug Administration (FDA). Bacteriological Analytical Manual (BAM), n. 8, 2004. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-vibrio>> Acesso em: 21 set. 2019.

EPAGRI. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. **As ações da Secretaria de Estado da Agricultura e da Pesca nas áreas de Agricultura e Pesca**. Edição: Epagri/GMC. Florianópolis, 2012a. 20p. Disponível em: <[http://intranetdoc.epagri.sc.gov.br/producao\\_tecnico\\_cientifica/DOC\\_25402.pdf](http://intranetdoc.epagri.sc.gov.br/producao_tecnico_cientifica/DOC_25402.pdf)>. Acesso: 01 jun 2019.

EPAGRI. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. **Síntese Anual da Agricultura de Santa 2017-2018**. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina/Centro Socioeconômico e Planejamento Agrícola – EPAGRI/CEPA. Florianópolis, 2018. n.39. P. 168- 170. Disponível em: <<https://cepa.epagri.sc.gov.br/index.php/publicacoes/sintese-anual-da-agricultura/>>. Acesso em: 01 jun. 2019.

EUROPEAN COMMISSION. Oyster. **Fisheries and Aquaculture in Europe**, n. 60. p. 9-10, 2013.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **National Aquaculture Sector Overview Brazil**. Fisheries and Aquaculture Department, 2019. 10p. Disponível em: <[http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso\\_brazil/en](http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_brazil/en)>. Acesso em: 01 jun.2019.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. **El estado Mundial de la Pesca e la Acuicultura**. Roma, 2018. 250p. Disponível em: <<http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture/es/>>. Acesso em: 01 jun. 2019.

FDA. Food and Drug Administration. Bacterial and Viral Pathogens of Greatest Concern in Seafood Processing - Public Health Impacts. **Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guindace**. n.4, p. 451- 454, 2019. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/80637/download>>. Acesso: em: 12 ago. 2019.

FERNANDEZ-PIQUER, J.; BOWMAN, J. P.; ROSS, T.; TAMPLIN, M. L. Molecular analysis of the bacterial communities in the live Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the influence of postharvest temperature on its structure. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 6, p1134-1143, 2012.

FORSYTHE,S.J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. Tradução: BIANCHINI, A. *et al.*; revisão técnica: Eduardo Cesar Tondo. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 607p.

FUSCO, G.; APREA, G.; GALIERO, G.; GUARINO, A.; VISCARDI, M. *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., Hepatitis a virus and norovirus in bivalve molluscs in Southern Italy. **Veterinaria Italiana**, v. 49, n. 1, p. 55-58, 2013.

GALVÃO, J. A.; OETTERER, M.; FURLAN, F.É. Mexilhão: Controle de Qualidade, Beneficiamento e Industrialização. In GALVÃO, J. A.; OETTERER, M. **Qualidade e Processamento de Pescado**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. p. 149-179.

GARBOSSA, L. H. P.; SOUZA, R. V.; CAMPOS, C. J. A.; VANZ, A.; VIANNA, L. F. N.; RUPP, G. S. Thermotolerant coliform loadings to coastal areas of Santa Catarina (Brazil) evidence the effect of growing urbanisation and insufficient provision of sewerage infrastructure. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, p. 1–12, 2017.

GONÇALVES, A.A. Resfriamento e Congelamento. In: GONÇALVES, A.A. **Tecnologia do Pescado: Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação**. São Paulo: EditoraAtheneu, 2011. p.108-132.

GOSLING, E.M. **Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture**. 1. ed. [S.1]: Blackwell Publishing, 2002.443p.

GRAM, L.; HUSS, H. H. Microbiological spoilage of fish and fish products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 121-137, 1996.

GYAWALI, P.; FLETCHER, G. C.; MCCOUBREY, D-J.; HEWITT, J. Norovirus in shellfish: An overview of post-harvest treatments and their challenges. **Food Control**, v. 99, n. p171-179, 2019.

HUSS, H. H.; GRAM, L. Pathogenic bacteria. In: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). **Assessment and Management of Seafood Safety and Quality**. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Rome: 2004, p. 26-52. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/y4743e/y4743e09.htm#bm9>> Acesso em: 12 ago. 19.

ISO 16649-3:2015. International Organization for Standardization. **Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of  $\beta$ -glucuronidase-positive *Escherichia coli* – Part 3: Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide**. 2015.

ISO 6579-1:2017. P International Organization for Standardization art 1: Detection of *Salmonella* spp. Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*. 2017

KIM, Y-M.; PAIK, H-D.; LEE, D-S. Shelf-life characteristics of fresh oysters and ground beef as affected by bacteriocin-coated plastic packaging film. *Science of Food and Agriculture*, v. 82, n. 9, p. 998-1002, 2002.

- LORCA, T.A.; PIERSON, M. D.; FLICK, G. J.; HACKNEY, C. R. Levels of *Vibrio vulnificus* and Organoleptic Quality of Raw Shellstock Oysters (*Crassostrea virginica*) Maintained at Different Storage Temperatures. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 11, p. 1716–1721, 2001.
- MADIGAN, T. L.; BOTT, N. J; TOROK, V. A.; PERCY, N. J.; CARRAGHER, J. F.; LOPES, M. A. B.; KIERMEIER, A. A microbial spoilage profile of half shell Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) and Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). **Food Microbiology**, v. 38, p. 219-227, 2014.
- MANNAS, H.; MIMOUNI, R.; CHAOUGY, N.; HAMADI, F.; MARTINEZ-URTAZA, J. Occurrence of *Vibrio* and *Salmonella* species in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) collected along the Moroccan Atlantic coast. **Springer Plus**. v. 3, 265p. 2014.
- MANZONI, G.C.; SCHMITT, J.F. **Cultivo de ostras japonesas *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia), na Armação do Itapocoroy**. Secretária Especial da Aqüicultura e Pesca (SEAP). Brasília, 2006. p.245-252.
- MIOTTO, L. A. **Coliformes termotolerantes e *Enterococcus* sp em ostras e águas salinas utilizadas para cultivo de moluscos bivalves da baía sul da ilha de Santa Catarina-Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Florianópolis 2009.
- MUDOH, M.F.; PARVEEN, S.; SCWARZ, J.; RIPPEN, T.; CHAUDHURI, A. The Effects of Storage Temperature on the Growth of *Vibrio parahaemolyticus* and Organoleptic Properties in Oysters. **Frontiers in Public Health**, v. 2, p. 1-7, 2014.
- NSSP. **National Shellfish Sanitation Program. Guia for the controle f molluscan shellfish 2017 revision**. 478p, 2017.
- POLI, C.R. O cultivo de ostras no Brasil *In*: JUNIOR, N.S.; SILVA, C.F.; RUPP, G.S BROGNOLI, F.F.; PERERIRA, A.; TEIXEIRA, A.L.; ARAÚJO, A.L. **Curso sobre cultivo de ostras**. Florianópolis: [s.n], 1995. p. 13-22.
- PORTELA, C. G. **Avaliação da qualidade da ostra nativa *Crassostrea brasiliana* congelada em concha em função da composição química e análise sensorial**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2005.
- POTTINGER, S. R. **Some data on pH and freshness of shucked eastern oysters**. v.10, n .9, 1948.
- RAMOS, R. J.; MIOTTO, L. A.; MIOTTO, M.; SILVEIRA, N. J.; CIROLINI, A.; SILVA, H. S.; RODRIGUEZ, D. P.; VIEIRA, C. R. W. Occurrence of potentially pathogenic *Vibrio* in oysters (*Crassostrea gigas*) and waters from bivalve mollusk cultivations in the South Bay of Santa Catarina. **Revista da Sociedade da Brasileira de Medicina Global**, v. 47, n. 3, p. 327-333, 2014
- RAMOS, R. J.; PEREIRA, M. A.; MIOTTO, L. A.; FARIA, R. D.; SILVEIRA N. J.; VIEIRA, C. R. W. Ocurrência de *Vibrio* spp., positive coagulase staphylococci and enteric bacteria in oysters (*Crassostrea gigas*) harvested in the south bay of Santa Catarina island, Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n.3, p. 478-484, 2012.



RAMOS, R. J. ***Vibrio* sp. em ostras e águas de áreas de cultivo da baía sul de santa catarina: ocorrência, caracterização feno e genotípica, suscetibilidade antimicrobiana e depuração.** Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Florianópolis 2012.

RUBINI S.; GALLETI, G.; D'INCAU, M.; GOVONI, G.; BOSCHETTI, L.; BERARDELLI, B.; BARBIERI, S.; MERIALDI, G.; FORMAGLIO, A.; GUIDI, E.; BERGAMINI, M.; PIVA, S.; SERRAINO, A.; GIACOMETTI, F. Occurrence of *Salmonella* enterica subsp. entericain bivalve molluscs and associations with *Escherichia coli* in molluscs and faecal coliforms in seawater. **Food Control**, v. 84, p. 429-435, 2018.

RUPP, G.S. Biologia de Ostras. *In*: JUNIOR, N.S.; SILVA, C.F.; RUPP, G.S BROGNOLI, F.F.; PERERIRA, A.; TEIXEIRA, A.L.; ARAÚJO, A.L. **Curso sobre cultivo de ostras.** Florianópolis: [s.n], 1995. p. 02-04.

SANTOS, A.A.; GIUSTINA, E.G.D. **Síntese informativa da maricultura 2017.** Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI). Florianópolis, 2018. p. 1-8.

SILVA, F.C. Área de Cultivo *In*: JUNIOR, N.S.; SILVA, C.F.; RUPP, G.S BROGNOLI, F.F.; PERERIRA, A.; TEIXEIRA, A.L.; ARAÚJO, A.L. **Curso sobre cultivo de ostras.** Florianópolis: [s.n], 1995. p. 22-37.

SILVA, H.S. **Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em moluscos bivalves produzidos em Santa Catarina e desenvolvimento de método para quantificação por PCR em tempo real.** Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Florianópolis 2016.

SOUZA, J F. Custo de produção da ostra cultivada. n. 3, p. 23, 2003. Disponível em:<[http://docweb.epagri.sc.gov.br/website\\_cepa/publicacoes/Custo\\_Ostra.pdf](http://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepa/publicacoes/Custo_Ostra.pdf)> Acesso em: 20 ago. 2019.

SOUZA, R. V. de; PETCOV, H. F. D. Comércio legal de moluscos bivalves. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - EPAGRI. **Boletim Didático, nº 95.** Florianópolis: 2013. 58 p.

SOUZA, R.V. de; RUPP, G.S.; CAMPOS, C.J.A. de; LEE, R. Moluscos bivalves: medidas de controle microbiológico para atender às exigências da União Europeia. EPAGRI. **Documentos, 247.** Florianópolis: 2014. 48p.

SOUZA. D. S. M. Ramos, A. P. D.; Nunes, F. F.; Moresco, V.; Taniguchi, S.; LEAL, D. A. G.; Sasaki, S. T.; Bicego, M. C.; Montone, R. C.; Durigan, M.; Teixeira, A. L.; Pilotto, M. R.; DELFINO, N.; FRANCO, R. M. B.; MELO, C. M. R.; BAINY, A. C. D.; BARARDI, C. R. M. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, n.1, p. 153-161, 2012.

SU, Y.-C.; YANG, Q. HASE, C. Refrigerated Seawater Depuration for Reducing *Vibrio parahaemolyticus* Contamination in Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 6, p. 1111–1115, 2010.

SUPLICY, F. M. **Plano Estratégico para Desenvolvimento Sustentável da Maricultura Catarinense (2018-2028)**. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI). Florianópolis, 2018. 87p.

TRIBUZI, G. **Desenvolvimento de alternativas tecnológicas para o processamento e conservação da carne de Mexilhão**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 2013.

UE. União Europeia. **Regulamento (CE) nº 2073/2005 da comissão de 15 de Novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. 2005.**

UE. União Europeia. **Regulamento (CE) nº do parlamento europeu e do conselho de 29 de Abril de 2004 que estabelece regras específicas de organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano. 2004.**

WHEATON, F. Review of the properties of Eastern oysters, *Crassostrea virginica*: Part I. Physical properties. **Engenharia Aquacultural**, v. 37, n.1, p. 3 a 13, 2007.