



**COMPARAÇÃO ENTRE O PERFIL
MICROBIOLÓGICO DE OSTRAS
CULTIVADAS E COMERCIALIZADAS
NO ESTADO DO PARANÁ E NA
REGIÃO NORDESTE DO BRASIL:
SITUAÇÃO ATUAL E RISCOS
POTENCIAIS PARA A SEGURANÇA
ALIMENTAR DOS CONSUMIDORES**



2016

I IDENTIFICAÇÃO DA PROPOSTA

1.1 Concedente

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

CNPJ/MF

33.654.831/0001-36

1.2 Beneficiário

Nome: Antonio Ostrensky Neto

CPF/MF

613.846.159-20

1.3 Finalidade

Concessão de auxílio financeiro a projeto de natureza de inovação.

1.4 Título do projeto

Comparação entre o perfil microbiológico de ostras cultivadas e comercializadas no estado do Paraná e na região Nordeste do Brasil: situação atual e riscos potenciais para a segurança alimentar dos consumidores

1.5 Chamada:

Universal - MCTI/CNPQ N ° 01/2016

2 QUALIFICAÇÃO DO PRINCIPAL PROBLEMA A SER ABORDADO

O papel do manejo na inter-relação entre produção, ambiente e segurança alimentar são temas de discussão recorrente na produção de animais aquáticos (Northen, 2001). Isto porque, quando se pensa na aquicultura, a questão ambiental (justificadamente ou não) tem sido historicamente explorada pelos seus detratores como uma atividade que representa elevados riscos tanto ao meio ambiente quanto aos consumidores (Ostrensky *et al.*, 2008).

Resíduos excretados pelos organismos aquáticos, contrariamente ao observado em animais terrestres, são de difícil coleta, dissolvendo-se, diluindo-se, permanecendo em suspensão na água de cultivo ou depositando-se no fundo nas áreas de cultivo. A presença destes resíduos contribui para o aumento de matéria orgânica no ambiente, o que pode causar alterações na macro e na microbiota locais (Zhou *et al.*, 2009; Ottinger *et al.*, 2016), redução da qualidade da água (Widdows e Brinsley, 2002; Gaspar *et al.*, 2011) e, conseqüentemente, do desempenho zootécnico e até mesmo da qualidade mercadológica dos animais cultivados (Alves, 2006). Além disso, outros danos ambientais podem decorrer de um manejo incorreto, como, por exemplo, a disseminação de doenças ou a introdução de espécies exóticas invasoras (Grigorakis, 2011).

A denominação de alimento seguro depende não só de como o organismo aquático é cultivado, mas sim, de como toda a cadeia de produção e de distribuição é operada (Al-Busaidi *et al.*, 2016). No caso das ostras, isso inclui também as etapas de depuração (se realizada), o transporte, o processamento, o armazenamento e a distribuição do produto (Mizan *et al.*,

2015; Zanin *et al.*, 2015). Por isso, a adoção de medidas que visem à manutenção da qualidade do alimento até que esse chegue à mesa do consumidor final são indispensáveis.

O consumo de ostras tem aumentado consideravelmente em todo o mundo nas últimas duas décadas (Serment-Moreno *et al.*, 2015) e, paralelamente, o número de surtos associados ao consumo deste molusco vem aumentando proporcionalmente, sendo a maioria dos casos relatados nos Estados Unidos, Europa, Ásia e Austrália (Laing, 2013). O vírus da hepatite A e os calicivírus são os principais agentes etiológicos associados aos surtos envolvendo ostras, seguido das bactérias do gênero *Vibrio* (*V. parahemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. mimicus*, *V. hollisae*), além de *Salmonella* sp., *Shigella* (*S. flexneri*, *S. sonnei*), *Plesiomonas shigelloides* e *Listeria monocytogenes* (Potasman, 2002; Fang *et al.*, 2015). Moluscos bivalves também podem transmitir doenças causadas por protozoários, sendo os principais *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* e *Toxoplasma gondii* (Robertson, 2007).

Além dos vírus, bactérias e protozoários, as ostras podem veicular biotoxinas (Turner *et al.*, 2012; Turner *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2013). As biotoxinas são formadas por algumas espécies de microalgas nocivas e podem causar vários tipos de intoxicações, entre elas: toxinas paralisantes (PSP), toxinas amnésicas (ASP), neurotoxinas (NSP), toxinas diarreicas (DSP), entre outras (Brasil, 2012).

As ostras se alimentam de plâncton pelo processo de filtração da água. Na presença de micro-organismos patogênicos ou microalgas nocivas na água, estes são retidos e concentrados no trato gastrointestinal dos moluscos. Caso o processamento e preparo das ostras não seja eficiente na remoção (depuração) ou destruição (cozimento) destes micro-organismos ou toxinas, o consumo de ostras pode representar um perigo à saúde pública (Robertson, 2007). Para potencializar esse problema, na maioria das vezes, as ostras cultivadas e comercializadas no Brasil são consumidas cruas.

Alguns patógenos associados à esses moluscos podem estar naturalmente presentes nas águas de cultivo, como *V. parahemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. cholerae* (não-O1 e não-O139). Outros patógenos são geralmente associados à presença de contaminação fecal nas águas, tais como *V. cholerae* O1 e O139, *Salmonella* sp, *E. coli*, *Shigella* sp, *Campylobacter jejum*, *Yersinia enterocolitica* além do vírus da hepatite A e Norovirus (Fda, 2011).

A maioria das doenças alimentares relacionadas ao consumo de ostras é de curta duração e autolimitada, no entanto, em alguns casos, pode ser fatal, principalmente quando se trata do vírus da hepatite A e *V. vulnificus* infectando pessoas imunodeprimidas (Potasman, 2002). *Salmonella*, uma bactéria Gram-negativa, é uma das principais causas de infecções de origem alimentar em todo o mundo. No sudeste da Ásia e da América, *Salmonella* é uma causa comum de doenças gastrointestinais e é responsável por cerca de 1,4 milhões de casos de infecções que costumam levar à morte a cada ano (Brands *et al.*, 2005; Ponce *et al.*, 2008)

Importante ressaltar que as bactérias sobre as quais a legislação brasileira (Resolução RDC 12, de janeiro de 2001) estabelece limites máximos de contaminação quase sempre não alteram a aparência física do pescado. A razão de suas limitações está relacionada ao fato de serem organismos patogênicos ao homem e não deterioradoras do produto.

Neste projeto, entretanto, será utilizada uma nova metodologia de análise de micro-organismos presentes nas ostras (um método molecular de última geração), que permitirá a pesquisa e quantificação não só das bactérias exigidas por lei, mas também de outros micro-organismos patogênicos para as ostras e/ou para os consumidores. Desta forma, será possível

completo mapeamento dos micro-organismos presentes nas ostras produzidas em diferentes estados e regiões brasileiras, a partir da análise direta das amostras, ou seja, sem a necessidade da utilização de meios de cultivo ou de provas bioquímicas, resultando em uma maior agilidade e acurácia do processo.

O método molecular permite uma detecção rápida e seletiva de micro-organismos em diferentes matrizes, por detectar fragmentos específicos de genes. O principal ponto positivo para justificar a detecção de micro-organismos em alimentos usando técnicas moleculares é a sua alta sensibilidade e especificidade. A sensibilidade depende, não somente das condições de reação, mas principalmente da composição da amostra e do método de extração do DNA (Sheu, 1998).

O avanço biotecnológico tem permitido o desenvolvimento de novas técnicas com a finalidade de diminuir o tempo de detecção, aumentar a sensibilidade e a especificidade de detecção, além de avaliar com mais acurácia a eficiência dos métodos de depuração de patógenos. Sendo assim, os métodos tradicionais têm sido gradativamente substituídos por kits enzimáticos de detecção rápida e ainda pelas técnicas moleculares baseadas na detecção do DNA bacteriano a partir de plataformas específicas em reações de hibridização molecular, precedidas pela amplificação gênica (Correa, 2006).

A proposta do presente projeto é monitorar a qualidade microbiológica das ostras cultivadas no litoral paranaense e nordestino e fazer um amplo levantamento da qualidade microbiológica das ostras comercializadas em todas as microrregiões do estado do Paraná, sejam elas originadas de cultivos realizados no próprio estado ou provenientes de outros estados.

Mas, além disso, uma parceria entre o Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais e o SEBRAE/AL vai possibilitar que os resultados obtidos no presente projeto cheguem, na forma de informações de fácil compreensão, ao elo inicial da cadeia de produção e de distribuição de ostras cultivadas: os produtores. A proposta é que o produto final deste projeto seja utilizado em um manual de boas práticas produtivas e profiláticas, que o Sebrae vai utilizar nas suas atividades junto ao setor produtivo. Espera-se, com isso, que o projeto contribua para a melhoria da qualidade higiênico-sanitária das ostras cultivadas no país.

3 OBJETIVOS E METAS A SEREM ALCANÇADOS

3.1 Objetivos

3.1.1 Geral

Identificar e avaliar a microbiota associada a ostras produzidas e comercializadas no estado do Paraná e na região Nordeste do Brasil.

3.1.2 Específicos

- Identificar os principais locais de comercialização de ostras cultivadas nos estados do Paraná, Sergipe, Alagoas, Paraíba e Rio Grande do Norte;
- Identificar as principais formas de apresentação das ostras comercializadas na área de estudo;

- Identificar e quantificar a microbiota existente nas ostras analisadas;
- Avaliar os efeitos da origem, do local de coleta e da forma de apresentação das ostras analisadas sobre a microbiota identificada e quantificada nesses animais;
- Identificar as bactérias potencialmente patogênicas à saúde do consumidor e estimar se existem riscos aos consumidores dessas ostras.

3.2 Metas

- Realizar quatro campanhas amostrais em cinco estados do território brasileiro ao longo de 12 meses para avaliação da microbiota presente em ostras produzidas e comercializadas nesses estados.
- Realizar ao menos uma campanha amostral em cada um dos principais centros de comercialização de ostras em 10 microrregiões geográficas (Noroeste, Centro Ocidental, Norte Central, Norte Pioneiro, Centro Oriental, Oeste, Sudoeste, Centro Sul, Sudeste, Metropolitana de Curitiba) do estado do Paraná.
- Analisar amostras de ostras de pelo menos uma área de cultivo por estado da região Nordeste.
- Publicar, em parceria com o SEBRAE-AL, um manual técnico, de fácil leitura e compreensão, para orientar os produtores de ostras a produzir produtos de maior qualidade.

3.3 Indicadores de acompanhamento

Meta	Descrição	Indicador
1	Estudar durante a microbiota de ostras produzidas e comercializadas em 5 estados do território brasileiro	Registro dos resultados do sequenciamento genético da microbiota das ostras
2	Pesquisar pontos de comercialização de ostras em 10 regiões geográficas (Noroeste, Centro Ocidental, Norte Central, Norte Pioneiro, Centro Oriental, Oeste, Sudoeste, Centro Sul, Sudeste, Metropolitana de Curitiba) do estado do Paraná	Registro em planilha dos mercados e peixarias que comercializam ostras em todo estado
3	Analisar amostras de ostras de pelo menos um ponto de comercialização por microrregião do estado do Paraná	Avaliação dos resultados encontrados para a microbiota de ostras comercializadas no Paraná; publicações científicas
4	Analisar amostras de ostras de pelo menos uma área de cultivo por estado da região Nordeste	Avaliação dos resultados encontrados para a microbiota de ostras produzidas no Nordeste; publicações técnicas e científicas

4 METODOLOGIA A SER EMPREGADA

4.1 Área de estudo

Os estudos serão realizados no estado do Paraná, localizado na região Sul do país e nos estados de Sergipe, Alagoas, Paraíba e Rio Grande do Norte, localizados na região Nordeste.

4.1.1 Estado do Paraná

As ostras (in natura e industrializadas) utilizadas nas análises microbiológicas serão provenientes de mercados municipais e peixarias, localizados em diferentes cidades do estado do Paraná.

Para a definição das áreas a serem analisadas no estado, será adotada a classificação de regiões segundo IPARDES (2012). Portanto, o estado do Paraná será dividido em dez regiões geográficas: Noroeste, Centro Ocidental, Norte Central, Norte Pioneiro, Centro Oriental, Oeste, Sudoeste, Centro Sul, Sudeste, Metropolitana de Curitiba.

Serão primeiramente realizados contatos telefônicos para identificação dos pontos de venda. Depois, cada uma dessas regiões será visitada de carro e as ostras serão adquiridas nos estabelecimentos previamente identificados.

4.1.2 Região Nordeste

Serão utilizados 7 cultivos de ostras como pontos amostrais, distribuídos entre os estados de Sergipe (n=2), Alagoas (n=2), Paraíba (n=1) e Rio Grande do Norte (n=2), conforme identificado na Tabela I.

Tabela I. Coordenadas geográficas dos pontos de coleta de ostras nos estados de Alagoas, Paraíba, Sergipe e Rio Grande do Norte*.

Estado	Ponto	Local	Coordenadas
Sergipe	1	Povoado Pontal (Indiaroba)	S 11°29'03,5" O 37°24'56,6"
	2	Rio Parapuca (Brejo Grande)	S 10°31'57,3" O 36°29'22,4"
Alagoas	1	Barra de São Miguel	S 9°50'10,0" O 35°57'20,8"
	2	Passo de Camaragibe	S 91°8'44,2" O 35°25'16,1"
Paraíba	1	Estuário Mamanguape (Marcação)	S 6°47'5,9" O 34°59'44,8"
Rio Grande do Norte	1	Tibau do Sul - Umari	S 06°12'30,1" O 35°08'00,3"
	2	Macau	S 5°08'33,6" O 36°38'21,9"

4.2 Amostragem

4.2.1 Paraná

Cada amostra de ostra será composta por no mínimo 12 unidades (*in natura*) ou 200 gramas (industrializadas). As amostras serão armazenadas e mantidas em caixas isotérmicas, sob refrigeração (5 a 10°C) até o momento das análises. O intervalo de tempo entre a compra das ostras e o início das análises não deverá exceder 48 horas, conforme preconiza o *Codex Alimentarius* (1978) e o PNCMB (2013).

As caixas com as amostras serão enviadas por via aérea e/ou rodoviária até o Laboratório de Histologia e Microbiologia (LHM), pertencente ao GIA, localizado na Universidade Federal do Paraná, em Curitiba, Paraná.

4.2.2 Região Nordeste

Um técnico irá se deslocar, por via aérea, de Curitiba até Aracaju-SE, de onde partirá para visitar cada um dos sete pontos de coleta, totalizando 7 dias ininterruptos de atividades por campanha amostral.

As amostras coletadas serão enviadas por via aérea imediatamente após a coleta, para que o tempo total entre a coleta a campo e a chegada ao laboratório em Curitiba-PR, não seja nunca superior a 48 horas.

Os materiais e equipamentos para registro de dados e aquisição de amostras biológicas, incluirão:

- Disco de Secchi
- GPS
- Kits de transporte contendo, cada um: 1 caixa de isopor; 1 saco plástico transparente de 60 L; 1 lacre numerado; 1 *datalogger* programado para aferir a temperatura desde a coleta das ostras até a chegada ao laboratório, em Curitiba-PR; gelo gel; e, papelão para evitar o contato direto das ostras com o gelo gel, o que poderia provocar a mortalidade destes moluscos bivalves.
- Oxímetro
- pHmetro
- Planilhas para as anotações e registros
- Questionário de pesquisa para coleta de dados de campo
- Refratômetro

As caixas com as amostras serão enviadas por via aérea até o Laboratório de Histologia e Microbiologia (LHM).

4.3 Mensuração de variáveis abióticas

Durante os procedimentos de coleta, serão realizadas mensurações de variáveis abióticas para a caracterização dos pontos amostrais e das condições ambientais no momento da retirada das ostras da água. Para este procedimento, serão utilizados os equipamentos relacionados na Tabela 2.

Tabela 2. Variáveis que serão analisadas nos pontos de coleta de ostras nos estados de Sergipe (SE), Alagoas (AL), Paraíba (PB) e Rio Grande do Norte (RN).

Variável analisada	Unidade	Equipamento
Concentração de oxigênio dissolvido	mg/L	Oxímetro
pH	-	Medidor de pH portátil
Salinidade	-	Salinômetro/Refratômetro
Saturação de oxigênio dissolvido	%	Oxímetro
Temperatura	°C	Oxímetro
Transparência	cm	Disco de Secchi

Todas as variáveis mensuradas, bem como, as condições ambientais observadas no momento da coleta de amostras serão registradas em uma ficha de coleta e, posteriormente, compiladas em uma planilha digital.

4.4 Processamento das amostras

Ao chegar ao laboratório, as ostras passarão pelo processo de abertura e retirada da carne e líquido intervalvar. Em seguida, serão colocadas em sacos plásticos estéreis e maceradas para obtenção de uma amostra homogênea. Uma alíquota (200 µL) da amostra será retirada e inserida em frascos *eppendorf*.

4.5 Análises genéticas

Para a extração do DNA total das ostras será utilizado o kit Invitrogen (Purelink® Genomic DNA). O DNA total extraído das amostras será quantificado com o kit Qubit ds DNA High-Sensitivity (HS) Assay por fluorometria no equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer Invitrogen.

As análises genéticas serão realizadas de acordo com a metodologia proposta por Caporaso *et al.* 2011.

O gene *RNAr 16S* será amplificado em cada amostra a partir de uma PCR, em um sistema de 10 µL, contendo 5µL de DNA (20 ng/L), 1 µL de primer universal (515 F/806r), 1 µL do primer “adaptador” e 5 µL da enzima Klentaq DV Readymix. Os níveis de expressão gênica do gene 16S serão analisados em um termociclador (Veriti 96 well Applied Biosystems), com as reações realizadas a 94°C por 3 minutos para a desnaturação inicial do DNA, seguido do processo de amplificação de 25 ciclos a 94°C por 45 segundos para a desnaturação final; 50°C durante 30 segundos para o anelamento; 68°C durante 1 minuto para a extensão inicial e 10 minutos a 72°C para a extensão final. Mantendo após isso, as amostras entre 0 e 4°C.

Para a confirmação da amplificação, as amostras serão testadas em gel de agarose (1%) em tampão Tris/Borato/EDTA IX (Tris-HCl 0,09M; ácido bórico 0,09M e EDTA 0,002M). No gel, serão aplicados 3 µL da mistura feita com 2 µL de amostra e 2 µL de corante (BlueJuice Gel Loading Buffer 10X). Após esta etapa, será realizada a corrida eletroforética das amostras no gel (uma hora) em voltagem constante de 70 Volts na presença de tampão TBE IX. Juntamente com as amostras, será aplicado no gel, 3µL de marcador de peso molecular 1Kb. O gel será corado com brometo de etídio (1%) (15 minutos), lavado em água (10 minutos) e visualizado em uma câmara UVP 3UV Transilluminator Imaging System.

O sequenciamento das amostras será realizado na plataforma Illumina MiSeq de nova geração capaz de gerar informações sobre milhares de pares de bases em uma única corrida. O kit utilizado para o sequenciamento das amostras será o MiSeq Reagent Kit v2 (500cycle), pair end.

A partir do programa Qiime (Quantitative Insights Into Microbial Ecology), será feito o processamento de sequências para análise de agrupamentos e estabelecimento de unidades taxonômicas operacionais e comparação com bancos de dados genômicos para estabelecimento de linhagens bacterianas presentes.

5 PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS OU TECNOLÓGICAS DA PROPOSTA

5.1.1 Contribuições Científicas:

- Uma tese de doutorado (Curso de Pós-Graduação em Zoologia - UFPR);
- Dois trabalhos de iniciação científica;
- Pelo menos 3 trabalhos publicados em revistas com Qualis entre A1 e B2;
- Apresentação de pelo menos 2 trabalhos em eventos científicos.

5.1.2 Contribuição tecnológica

- Publicação de pelo menos dois artigos em revista de divulgação científica.
- Identificação e quantificação de micro-organismos potencialmente patogênicos em ostras produzidas e comercializadas em duas regiões do Brasil.
- Produção de um banco de dados contendo a microbiota existentes em ostras de diferentes origens e formas de armazenamento e comercialização.

6 ORÇAMENTO

Descrição do item	Valor unitário	Quant.	Unid.	Valor total
I. Custeio				
a. Material de consumo, componentes ou peças de reposição de equipamentos, softwares, instalação, recuperação ou manutenção de equipamentos				
Material de expediente (cartuchos para impressora, papel, canetas permanentes)	R\$ 2.000,00	1	unidade	R\$ 2.000,00
Material de consumo para adaptação da infraestrutura laboratorial (tintas, tijolos, areia, pedras, ferros, madeiras, lâmpadas, etc)	R\$ 8.000,00	-	Total	R\$ 8.000,00
Material descartável para laboratório (luvas, ponteiros, tubos eppendorf, sacos plásticos estéreis, etc.)	R\$ 2.000,00	-	Total	R\$ 2.000,00
Reagentes e kits para análises laboratoriais	R\$ 11.000,00	1	Conjunto	R\$ 11.000,00
b. Serviços de terceiros PF ou PJ (pagamento integral ou parcial de contratos de manutenção e serviços de terceiros, pessoa física ou jurídica, de caráter eventual)				
Pessoa Jurídica				
Manutenção de equipamentos	R\$ 18.000,00	1	unidade	R\$ 18.000,00
c. Passagens e diárias (despesas com deslocamento)				
Passagens aéreas	R\$ 1.480,00	7	unidade	R\$ 10.360,00
Diárias	R\$ 320,00	50	unidade	R\$ 16.000,00
Combustível	R\$ 3,72	2600	litros	R\$ 9.672,00

Total Custeio				R\$ 77.032,00
2.Capital				
Agitador de tubo Vórtex	R\$ 800,00	1	unidade	R\$ 800,00
Capela de fluxo laminar	R\$ 17.000,00	1	unidade	R\$ 17.000,00
Fechadura Biométrica / Senha / Cartão	R\$ 2.800,00	3	unidade	R\$ 8.400,00
Homogeneizador de amostras líquidas	R\$ 650,00	1	unidade	R\$ 650,00
Homogeneizador de amostras sólidas	R\$ 5.100,00	1	unidade	R\$ 5.100,00
Incubadora tipo B.O.D. Microprocessada com iluminação interna para fotoperíodo	R\$ 4.000,00	1	unidade	R\$ 4.000,00
Microcomputador	R\$ 3.500,00	2	unidade	R\$ 7.000,00
Total Capital				R\$ 42.950,00
Total solicitado ao CNPq				R\$ 119.982,00

6.1 Justificativas para a aquisição de bens e serviços de custeio.

Material de expediente (cartuchos para impressora, papel, canetas permanentes): Material de uso rotineiro em projetos de pesquisa.

Material de consumo para adaptação da infraestrutura laboratorial: (tintas, tijolos, areia, pedras, ferros, madeiras, lâmpadas, etc): A proposta é montar uma sala para realização de análises genéticas em espaço já existente no interior do Laboratório de Pesquisa com Organismos Aquáticos. O material solicitado será empregado nessa adaptação da infraestrutura laboratorial.

Material descartável de uso em laboratório (luvas, ponteiros, tubos eppendorf, sacos plásticos estéreis, etc.): Material de uso rotineiro em projeto de pesquisa envolvendo análises laboratoriais em geral e, neste caso, análises genéticas.

Reagentes e kits para análises laboratoriais: Kits e reagentes e materiais utilizados no pré-processamento de amostras e nas análises genéticas.

Manutenção de equipamentos e veículos: laboratórios de pesquisa geralmente sofrem com a falta de recursos para manutenção de equipamentos já existentes. O recurso solicitado será utilizado para garantir a manutenção e o funcionamento de equipamentos e veículos que não estão obrigatoriamente sendo solicitados aqui, mas que serão utilizados no projeto.

Passagens aéreas, diárias e combustíveis: O projeto prevê a realização de 4 campanhas amostrais na região Nordeste, uma grande campanha amostral por todo o estado do Paraná e o monitoramento regular de ostras cultivadas no litoral paranaense. Essas rubricas são, portanto, fundamentais para viabilização das coletas para obtenção do material biológico a ser analisado.

8 IDENTIFICAÇÃO DOS DEMAIS PARTICIPANTES DO PROJETO

Nome	Formação	Instituição	Função no projeto	Carga Horária semanal
Dr. Antonio Ostrensky	Oceanólogo	UFPR	Coordenação técnico-científica do projeto	8
Dr. Marcio Roberto Pie	Biólogo	UFPR	Análise de dados	2
Dra. Debora Pestana	Bióloga	GIA/UFPR	Análises laboratoriais e análise de dados	6
Dra. Gisela Geraldine Castilho Westphal	Médica Veterinária	UFPR	Coleta e análise de dados	6
MSc. Aline Horodesky	Bióloga	UFPR	Coleta, análises laboratoriais e de dados	20
MSc. Marcus Vinícius Fier Giroto	Zootecnista	GIA/UFPR	Coletas	6
A definir	A definir	A definir	Bolsista Apoio Técnico	16
A definir	A definir	A definir	Bolsista Iniciação Científica	12

8.1 Plano de Atividades do bolsista Apoio Técnico

Estão sendo solicitadas duas bolsas vinculadas ao presente projeto, uma de Iniciação Científica e outro de Apoio Técnico (Nível Superior). As atividades a serem desenvolvidas por ambos os bolsistas estão sintetizadas na tabela abaixo.

Atividade	Cronograma de execução (meses)
Pesquisa de material bibliográfico	1-36
Coletas	1-23
Preenchimento das planilhas com os dados obtidos em campo e laboratório	1-23
Recebimento, preparação de amostras	1-23
Biometrias e análises morfológicas de ostras	1-23
Sequenciamento genético	8-30
Análises e interpretação de resultados	9-35
Relatórios	Semestrais

A proposta é que ambos se envolvam basicamente com todas as etapas previstas no projeto, guardando, obviamente, as especificidades das condições individuais (um aluno já graduado e outro ainda em nível de graduação).

As tarefas serão supervisionadas tanto pelo coordenador geral da presente proposta (Antonio Ostrensky) como pela pesquisadora responsável pelo Laboratório de Histologia e Microbiologia (Dra. Gisela Geraldine Castilho Westphal).

9 GRAU DE INTERESSE E COMPROMETIMENTO DE EMPRESAS COM O ESCOPO DA PROPOSTA, QUANDO FOR O CASO

Atualmente há um grande interesse por parte de empresas privadas nos resultados de estudos como os que estão aqui sendo propostos. Mas, como se está apenas no início do desenvolvimento dessa tecnologia, numa fase ainda preponderantemente científica, não há um interesse da equipe executora do presente projeto em buscar parcerias junto à iniciativa privada neste momento. No entanto, após essa primeira fase, a proposta é se buscar tais parcerias para que as tecnologias de análise microbiológica possam ser aplicadas em escala comercial.

Nesta atual fase da pesquisa, por outro lado, foi estabelecida uma parceria com o Sebrae/AL, instituição com a qual o GIA tem trabalhado em conjunto desde o início de 2015, já tendo desenvolvido vários produtos de interesse para o setor privado e, em especial, para o pequenos e microprodutores de ostras.

No presente caso, o resultado final do projeto será transformado em uma cartilha, que deverá ser usada na orientação técnica dos ostreicultores atendidos pelo Sebrae. A proposta é buscar meios de garantir uma maior qualidade das ostras cultivadas e comercializadas por esses produtores.

10 INDICAÇÃO DE COLABORAÇÕES OU PARCERIAS JÁ ESTABELECIDAS COM OUTROS CENTROS DE PESQUISA NA ÁREA

Não haverá colaboração ou parceria com outros centros de pesquisa em um primeiro momento, mas apenas com o SEBRAE, coimo explicado anteriormente.

11 DISPONIBILIDADE EFETIVA DE INFRAESTRUTURA E DE APOIO TÉCNICO PARA O DESENVOLVIMENTO DO PROJETO

O Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA-UFPR) está sediado no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba (PR). Sua estrutura física é adequada para o desenvolvimento de pesquisas e estudos nas mais diversas áreas que envolvem a produção de organismos aquáticos e impactos ambientais. O GIA conta com dois laboratórios em Curitiba e um no litoral, no município de Pontal do Paraná, além de estreita e longínqua parceria com Laboratório de Dinâmica Evolutiva e Sistemas Complexos e com o Laboratório de Bioquímica e Genética (LBG), ambos coordenados pelo Dr. Marcio Roberto Pie, também professor da UFPR.

Laboratório de Pesquisa com Organismos Aquáticos (LAPOA): Tem uma estrutura de 600 m² e está equipado para a realização de experimentos com diferentes espécies de organismos aquáticos, inclusive organismos marinhos, apesar de Curitiba estar localizada a mais de 100 km do litoral. Atualmente o LAPOA está estruturado também para a realização de ensaios biológicos direcionados tanto à avaliação de impactos ambientais quanto ao desenvolvimento de novas tecnologias de produção de organismos aquáticos. O laboratório será utilizado no projeto para análises da qualidade da água nas regiões estudadas. Nele, caso haja necessidade, ostras poderão ser mantidas vivas para a realização de análises específicas ou mesmo de experimentos completos.

Laboratório de Histologia e Microbiologia (LHM): Em uma estrutura de 120 m² funciona um moderno laboratório capaz de realizar diversas análises químicas, histológicas e microbiológicas. O LHM dá apoio aos trabalhos de avaliação de impactos ambientais, além de realizar análises microbiológicas de ostras e outros organismos cultivados. Neste projeto, o laboratório será utilizado para recepção e pré-processamento das amostras coletadas, além de análises morfológicas das ostras coletadas.

Laboratório de Dinâmica Evolutiva e Sistemas Complexos e Laboratório de Bioquímica e Genética (LBG): Estes dois laboratórios contam com uma ampla estrutura para análises genéticas moleculares. São equipados com sequenciadores de nova geração e aparelhos essenciais para a realização de análises genéticas. O principal foco de ambos é o estudo de regulação da expressão gênica, ecologia molecular, macroecologia e macroevolução. Neste projeto serão utilizados para o desenvolvimento/aperfeiçoamento do método molecular e realização de análises microbiológicas nas ostras coletadas.

12 ESTIMATIVA DOS RECURSOS FINANCEIROS DE OUTRAS AGÊNCIAS

Neste momento o projeto não conta com apoio financeiro de outras agências de fomento. O Sebrae/AL investirá cerca de R\$ 300.000,00 na publicação do material de divulgação gerado a partir dos resultados do presente projeto, no treinamento e qualificação de técnicos e agentes multiplicadores e na difusão dos materiais a serem desenvolvidos. Mas, esses recursos não serão utilizados diretamente no projeto, apenas no pós-projeto. Por esse motivo, não foram aqui contabilizados como recursos financeiros disponibilizados para a realização do presente projeto de pesquisa submetido ao CNPq.

13 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-BUSAIDI, M. A.; JUKES, D. J.; BOSE, S. Seafood safety and quality: An analysis of the supply chain in the Sultanate of Oman. **Food Control**, v. 59, p. 651-662, 1// 2016. ISSN 0956-7135. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713515300505> >.

ALVES, J. M. C. Segurança alimentar na produção de organismos aquáticos. **Feed & Food – segurança alimentar para a saúde e bem-estar do homem**, v. 1, n. 4, p. 16-26, 2006.

BRANDS, D. A. et al. Prevalence of Salmonella spp. in oysters in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 893-897, 2005. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-13544273851&partnerID=40&md5=5096c48be2e0f8ec76bb519946fe9c3e> >.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Interministerial n° 07, 08/05/2012. 2012.

CORREA, A. A. Estudo sobre a dinâmica de depuração de ostras de cultivo (*Crassostrea gigas*) artificialmente contaminadas com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. **Dissertação de Mestrado UFSC**, 2006.

FANG, T. et al. Mathematical modeling of growth of Salmonella spp. and spoilage microorganisms in raw oysters. **Food Control**, v. 53, p. 140-146, 7// 2015. ISSN 0956-7135. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713515000390> >.

FDA, F. A. D. A. Fish and fishery products hazards and controls guidance. 2011.

GASPAR, M. B. et al. 10.08 - Restoring Coastal Ecosystems from Fisheries and Aquaculture Impacts A2 - Wolanski, Eric. In: MCLUSKY, D. (Ed.). **Treatise on Estuarine and Coastal Science**. Waltham: Academic Press, 2011. p.165-187. ISBN 978-0-08-087885-0.

GRIGORAKIS, K. R., G. Aquaculture effects on environmental and public welfare – The case of Mediterranean mariculture. **Chemosphere**, v. 85, n. 6, p. 899-919, 2011.

LAING, I. Oysters – Shellfish Farming☆. In: (Ed.). **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences**: Elsevier, 2013. ISBN 978-0-12-409548-9.

MIZAN, M. F. R.; JAHID, I. K.; HA, S.-D. Microbial biofilms in seafood: A food-hygiene challenge. **Food Microbiology**, v. 49, p. 41-55, 8// 2015. ISSN 0740-0020. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002015000131> >.

NORTHEN, J. R. Using farm assurance schemes to signal food safety to multiple food retailers in the U. K. . **International Food and Agribusiness Management Review**, v. 4, p. 37-50, 2001.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação - FAO, 2008. 276 p ISBN 978-85-60930-00-5+--.

OTTINGER, M.; CLAUSS, K.; KUENZER, C. Aquaculture: Relevance, distribution, impacts and spatial assessments – A review. **Ocean & Coastal Management**, v. 119, p. 244-266, 1// 2016. ISSN 0964-5691. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964569115300508> >.

PONCE, E. et al. Prevalence and characterization of Salmonella enterica serovar Weltevreden from imported seafood. **Food Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 29-35, 2008. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-35748968455&partnerID=40&md5=c0024c6a981fb708362f3cfe725b936> >.

POTASMAN, I. P., A.; ODEH, M. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 921-928, 2002.

ROBERTSON, L. J. The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 3, p. 201-216, 2007.

SERMENT-MORENO, V. et al. Monte Carlo analysis of the product handling and high-pressure treatment effects on the *Vibrio vulnificus* risk to raw oysters consumers. **Journal of Food Engineering**, v. 144, p. 86-92, 1// 2015. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877414003148> >.

SHEU, P. M. B., K.; STAHL, U. Detection of pathogenic and spoilage micro-organism in food with the polymerase chain reaction. **Food Microbiology**, v. 1513-31, 1998.

TURNER, A. D. et al. Investigations into matrix components affecting the performance of the official bioassay reference method for quantitation of paralytic shellfish poisoning toxins in oysters. **Toxicon**, v. 59, n. 2, p. 215-230, 2// 2012. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004101011100362X> >.

TURNER, A. D. et al. Feasibility studies into the production of gamma-irradiated oyster tissue reference materials for paralytic shellfish poisoning toxins. **Toxicon**, v. 72, p. 35-42, 9/15/ 2013. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010113002225> >.

WIDDOWS, J.; BRINSLEY, M. Impact of biotic and abiotic processes on sediment dynamics and the consequences to the structure and functioning of the intertidal zone. **Journal of Sea Research**, v. 48, n. 2, p. 143-156, 10// 2002. ISSN 1385-1101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138511010200148X> >.

XIE, W. et al. Accumulation and depuration of paralytic shellfish poisoning toxins in the oyster *Ostrea rivularis* Gould – Chitosan facilitates the toxin depuration. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 446-452, 4// 2013. ISSN 0956-7135. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512004318> >.

ZANIN, L. M. et al. Seafood safety: Knowledge, attitudes, self-reported practices and risk perceptions of seafood workers. **Food Research International**, v. 67, p. 19-24, 1// 2015. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996914006590> >.

ZHOU, Q. et al. Role and functions of beneficial microorganisms in sustainable aquaculture. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 16, p. 3780-3786, 8// 2009. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852408010973> >.