

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**

JULIANA DE FREITAS JUSTINO

**AVALIAÇÃO DE COLIFORMES E VÍRUS ENTÉRICOS NA
ÁGUA E NO MEXILHÃO (*Mytella guyanensis*) EM ÁREA DE
MANGUEZAL DA BAÍA DE VITÓRIA (ES)**

VITÓRIA
2009

JULIANA DE FREITAS JUSTINO

**AVALIAÇÃO DE COLIFORMES E VÍRUS ENTÉRICOS NA
ÁGUA E NO MEXILHÃO (*Mytella guyanensis*) EM ÁREA DE
MANGUEZAL DA BAÍA DE VITÓRIA (ES)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental na área de Saneamento.

Orientador: Prof^a Dr^a Regina de Pinho Keller

VITÓRIA
2009

JULIANA DE FREITAS JUSTINO

**AVALIAÇÃO DE COLIFORMES E VÍRUS ENTÉRICOS NA
ÁGUA E NO MEXILHÃO (*Mytella guyanensis*) EM ÁREA DE
MANGUEZAL DA BAÍA DE VITÓRIA (ES)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental na área de Saneamento.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Regina de Pinho Keller
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr. Sérgio Túlio A. Cassini
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-Orientador

Prof. Dr. Daniel Rigo
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador Interno

Prof^a. Dr^a. Maria Ines Zanoli Sato
Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
Examinador Externo

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

J96a Justino, Juliana de Freitas, 1984-
Avaliação de coliformes e vírus entéricos na água e no mexilhão (*Mytella guyanensis*) em área de manguezal da Baía de Vitória (ES) / Juliana de Freitas Justino. – 2009.
96 f. : il.

Orientadora: Regina de Pinho Keller.

Co-Orientador: Servio Tulio Alves Cassini.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Tecnológico.

1. Águas residuais. 2. Esgotos. 3. Estuários. 4. Mexilhão – Vitória, Baía de (ES). 5. Bactérias. 6. Vírus. 7. Água poluída por vírus. 8. Água – Poluição. I. Keller, Regina de Pinho. II. Cassini, Servio Tulio Alves. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Tecnológico. IV. Título.

CDU: 628

AGRADECIMENTOS

À Deus. Sem Ele, nada é possível.

À papai, mamãe, Lenny e Junior, co-responsáveis pela minha caminhada, a quem devo agradecimentos e desculpas pelas ausências.

Ao meu esposo Jean, a quem não tenho palavras que possam demonstrar todo seu apoio, companheirismo, compreensão e amor.

A minha orientadora Regina Keller por sua dedicação, companheirismo e pelas lições que servirão para toda a vida.

Ao meu co-orientador Sérgio Túlio, pelo auxílio e suporte em diversos momentos.

Às minhas amigas Fê e Vê, por todo apoio, tanto para compartilhar emoções como discutir soluções de problemas do mestrado.

À Caroline, minha companheira, por toda dedicação à esta pesquisa e amizade.

Aos amigos que conquistei da minha turma de mestrado e Labsan: Márcia, Paula, Carol, Catarina, Camila, Laila, Renata, Pedro, Amaury, Marcus. Jamais esquecerei o que cada um de vocês já fez por mim.

À Liliana Cruz Spano por sua constante contribuição e auxílio.

Aos examinadores dessa dissertação, pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento deste trabalho.

A todos do núcleo água que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À todos do Departamento de Biologia que tiveram compreensão, apoio e auxílio em dificuldades desta pesquisa, especialmente à Valeria Fagundes, Yuri Leite, Leonora Costa, Carol, Ana e Mari.

Ao Facitec pelo financiamento desta pesquisa.

Ao CNPQ, pela bolsa de mestrado.

“A persistência é o caminho do êxito”
(Charles Darwin)

RESUMO

As áreas costeiras promovem benefícios diversos à população, porém, são largamente afetadas pelo influxo de esgoto sanitário sem tratamento, acarretando em prejuízo para a saúde da população. A contaminação por patógenos emergentes, tais como os vírus entéricos, é um agravante. Estes patógenos, podem ser encontrados em diversos ambientes, sobreviver por longos períodos, e causar diversas doenças. O sistema estuarino da Baía de Vitória, local de estudo deste trabalho, é um exemplo de área costeira afetada. Por isso, buscou-se avaliar a qualidade microbiológica da água e de mexilhões (sururu do mangue - *Mytella guyanensis*) em área de manguezal do sistema estuarino da Baía de Vitória, analisando 3 locais de coleta de água desse estuário ao longo de 14 meses de monitoramento (fevereiro/2008 a março/2009). Foram avaliados parâmetros físico-químicos (pH, turbidez, condutividade elétrica e Sólidos Dissolvidos Totais – SDT), bacteriológicos (Coliformes Totais (CT) e *E. coli*) e virológicos (adenovírus, rotavírus e norovírus GII). Os vírus entéricos foram detectados por meio da técnica de PCR. Os resultados das análises físico-químicas revelaram maiores valores de turbidez e menores de condutividade e SDT nos meses mais chuvosos, especialmente no ponto mais próximo ao rio. Os resultados das análises bacteriológicas revelaram elevada contaminação do sururu, com densidades de até 10^6 NMP/25g de CT. Nas amostras de água, foram observadas densidades de até 10^5 NMP/100mL de CT, no ponto de coleta mais próximo ao cais do bairro. Valores mais elevados foram obtidos após eventos chuvosos. Quanto aos resultados das análises virológicas, adenovírus (AdV) foram detectados em 76,7% das amostras de água e de rotavírus (RV) em 88,1%. Nas amostras de sururu, AdV e RV foram detectados em 100% das amostras, evidenciando sua capacidade de concentrar partículas do meio circundante. O norovírus foi detectado em 4,8% das amostras de água e não foi detectado no sururu. A elevada contaminação fecal observada em pontos do estuário e do sururu indicam que esta área está sob impacto antropogênico. Assim, esta pesquisa torna-se um importante auxílio à decisões de implantação de medidas de proteção a este ambiente e na prevenção de surtos relacionados ao consumo de moluscos bivalves contaminados.

Palavras-chave: Esgoto Sanitário. Estuário. Mexilhão. Bactérias Indicadoras. Vírus Entéricos. Contaminação Fecal.

ABSTRACT

Coastal areas promote many population benefits but has been affected by large and constant sewage inflows that can be a health risk for humans besides the incidence of emerging pathogens as enteric viruses. These pathogens can be detected in several environment, survive for long periods and cause a wide variety of illnesses. The Vitoria Bay estuarine system, area studied of this work, is suspected to be under anthropogenic impact. Therefore, the aim of this work was assess water and shellfish (*Mytella guyanensis*) microbiological quality in Vitória Bay mangrove area from three sampling sites over 14-month monitoring (february/2008 to March/2009). Parameters evaluated was physicochemical (pH, turbidity, conductivity and Total Dissolved Solids - TDS), bacterial indicators (Total Coliforms - TC and *E. coli*) and viral pathogens (adenovirus, rotavirus and norovirus). Enteric viruses were detected by PCR. Physicochemical results showed maximum turbidity and minimum conductivity and TDS in the rainy months, specially in the sampling site near the mouth of the river. Bacteriological analysis showed shellfish and water contamination, with TC densities up to 10^6 MPN/25g in shellfish and up to 10^5 MPN/100mL on sampling site near the pier and houses. Highest values were obtained after rainfall events. About virological analysis, adenovirus (AdV) were detected in 76,7% and rotavirus (RV) in 88,1% of the water samples. AdV and RV were detected in 100% of the shellfish samples, despite shellfish bioaccumulation. Norovirus was detected in 4.8% of shellfish samples and wasn't detected in shellfish samples. Monitoring was able to show high fecal contamination in the estuary and shellfish samples and becoming an important tool in decisions about deployment of environment protection.

Keywords: Sewage. Estuary. Shellfish. Bacterial indicators. Enteric viruses. Fecal contamination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa do sistema estuarino da Baía de Vitória.....	22
Figura 2: Vista parcial de mangue do sistema estuarino da Baía de Vitória.....	23
Figura 3: Partícula de Adenovírus. Localização de proteínas e material genético.	31
Figura 4: Partícula de rotavírus. Localização de proteínas e visualização tridimensional.....	33
Figura 5: Partícula de norovírus.	34
Figura 6: Mapa do município de Vitória, destacando a região mais próxima a parte do sistema estuarino estudado	46
Figura 7: Mapa do sistema estuarino da Baía de Vitória.....	47
Figura 8: Vista dos pontos de coleta de água (P1, P2 e P3) e de marisco (P2) no sistema estuarino da Baía de Vitória.	48
Figura 9: Visualização do resultado em cartelas. A: Visualização de poços amarelos correspondendo ao resultado positivo para Coliformes Totais; B: Visualização de poços fluorescentes sob luz UV, correspondendo ao resultado positivo para <i>E. coli</i> (B)	51
Figura 10: Recipiente de pressão para dispensação (Millipore), constituído por uma bomba à vácuo (a), recipiente onde o volume de água é adicionado (b) e local para inserção da membrana (c). Também é possível visualizar a amostra após filtração (d).	53
Figura 11: Visualização de etapas realizadas no processamento do sururu: lavagem (A), abertura (B), remoção da porção gastrointestinal (C) homogeneização com solução tampão (D).....	54
Figura 12: Monitoramento da turbidez e valores acumulados de chuva para os cinco dias anteriores ao dia de coleta, de fevereiro/2008 a março/2009.....	59
Figura 13: Monitoramento da condutividade e valores acumulados de chuva para os cinco dias anteriores ao dia de coleta, de fevereiro/2008 a março/2009.....	60
Figura 14: Resultados do parâmetro Sólidos Dissolvidos Totais (SDT) para o período de monitoramento de fevereiro/2008 a março/2009.	60

Figura 15: Vista parcial do sistema estuarino da Baía de Vitória, com ênfase no aspecto visual da água em dia de coleta precedida por precipitação pluviométrica elevada (fev/08 - A) e baixa (abr/08 - B).....	62
Figura 16: Monitoramento de coliformes totais (NMP) de fevereiro de 2008 a Março de 2009 nos três pontos de coleta de água e no sururu	63
Figura 17: Monitoramento de <i>E. coli</i> (NMP) de fevereiro de 2008 a Março de 2009 nos três pontos de coleta de água e no sururu.....	63
Figura 18: Limite estabelecido pela legislação brasileira para a qualidade de água recreacional (CONAMA 274/2000), considerando-se a tolerância de <i>E. coli</i> , para cada ponto de coleta de água	67
Figura 19: Detecção em gel de agarose de produto da nested-PCR para Rotavírus (banda de 346pb)	72
Figura 20: Detecção em gel de agarose de produto da nested-PCR para Adenovírus (banda de 173pb).	73
Figura 21: Detecção em gel de agarose de produto da nested-PCR para Norovírus (banda de 201pb).....	73
Figura 22: Frequência de amostras positivas para AdV e RV no período de fevereiro de 2008 a Março de 2009 de água nos pontos de coleta de água.....	75
Figura 23: Frequência de amostras positivas para AdV , RV e NoV GII, no período de fevereiro de 2008 a Março de 2009 nos pontos de coleta de água.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Patógenos comumente isolados de águas costeiras recreacionais..	26
Tabela 2: Resultados obtidos por pesquisadores em diferentes países ao longo dos anos	39
Tabela 3: Normas relativas ao limites microbiológicos para avaliação de águas recreacionais	43
Tabela 4: Normas relativas ao limites microbiológicos para avaliação da qualidade microbiológica de moluscos bivalves.....	45
Tabela 5: Pontos de Amostragem.....	47
Tabela 6: Distâncias aproximadas entre os pontos de coleta.....	47
Tabela 7: Resumo das metodologias de análises físico-químicas	50
Tabela 8: Concentrações finais dos reagentes da PCR em cada reação	56
Tabela 9: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores	57
Tabela 10: Estatística descritiva dos parâmetros físico-químicos analisados durante os 14 meses de monitoramento (n=14).....	61
Tabela 11: Resultados de estatística descritiva da concentração de Coliformes Totais (CT) e <i>E. coli</i> nas amostras pesquisadas	64
Tabela 12: Monitoramento de Adenovírus (AdV) e Rotavírus (RV) em amostras de água, nos três pontos de coleta em área de manguezal	71
Tabela 13: Síntese dos resultados de detecção de AdV, RV e NoV GII nas amostras de água	71
Tabela 14: Detecção de vírus entéricos em amostras de água observada por diferentes autores.....	74
Tabela 15: Detecção de vírus entéricos em amostras de moluscos bivalves observada por diferentes autores	78

LISTA DE SIGLAS

As – Arsênio

Cd – Cádmió

cDNA – DNA complementar

CE – Conselho Europeu

CEE – Comunidade Econômicã Europeia

CESAN - Companhia Espirito Santense de Saneamento

cm – centímetro

CNCMB - Comitê Nacional de Controle Higiénico-Sanitário de Moluscos Bivalves

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

Cr - Cromo

CT - Coliformes Totais

DEA – Departamento de Engenharia Ambiental

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

DNTP - Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

ES - Espirito Santo

FDA – *Food and Drug Administration*

Fe - Ferro

GPS – Sistema de Posicionamento Global

°C – grau Celsius

ha - hectare

Hg – Mercúrio

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia

kb - quilobase

km – quilômetro

L - Litro

LABSAN - Laboratório de Saneamento

M - Molar

mM - milimolar

mg - miligrama

mL - mililitro

Mn – Manganês

mS/cm - milisiemens por centímetro

µL – microlitro

µm – micrometro

µM - micromolar

µg– micrograma

n - número de amostras

nm - nanômetro

Ni – Níquel

NMP - Numero Mais Provável

NSP - *Non Structural Protein*

NSSP - *National Shellfish Sanitation Program*

OMS - Organização Mundial da Saúde

ORF - *Open Reading Frame*

P1 – Ponto 1

P2 – Ponto 2

P3 – Ponto 3

Pb - Chumbo

pb – par de base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PEG - Polietilenoglicol

pH - Potencial Hidrogeniônico

PNGC - Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro

p/v - peso/volume

RNA - Ribonucleic Acid

RT-PCR – *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

s - segundo

SDT - Sólidos Dissolvidos Totais

SRSV - *Small Round Structured Viruses*

SVS/MS - Secretaria de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde

TE – Tris/EDTA

TBE – Tris/Borato/EDTA

U - Unidade

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

USEPA - *United States Environmental Protection Agency*

UV – Ultravioleta

V - Volt

VP - *Viral Protein*

Zn - Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1 O SISTEMA ESTUARINO DA BAÍA DE VITÓRIA E O MANGUEZAL	21
3.2 A POLUIÇÃO DOS CORPOS D'ÁGUA	25
3.3 AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM AMOSTRAS AMBIENTAIS.....	28
3.3.1 Bactérias indicadoras de contaminação fecal em ambientes marinhos..	28
3.3.2 Vírus entéricos	30
3.3.2.1 Adenovírus Humano	30
3.3.2.2 Rotavírus	32
3.3.2.3 Norovírus	34
3.3.2.4 Métodos de detecção de vírus em ambientes aquáticos e em mariscos.....	35
3.4 A CONTAMINAÇÃO DE MOLUSCOS BIVALVES	37
3.5 LEGISLAÇÃO REFERENTE À QUALIDADE DE ÁGUA E DE MOLUSCOS	40
3.5.1 Águas	40
3.5.2 Moluscos Bivalves	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 COLETA AMOSTRAL	48
4.2 ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE.....	49
4.3 ANÁLISES LABORATORIAIS	49
4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE ÁGUA.....	49
4.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS REALIZADAS NAS AMOSTRAS DE ÁGUA E DO MEXILHÃO	50
4.5.1 Bactérias	50
4.5.2 Vírus	51

4.5.2.1	Concentração das amostras de água	52
4.5.2.2	Eluição das partículas virais do mexilhão	53
4.5.2.3	Extração dos ácidos nucleicos.....	54
4.5.2.4	Síntese de DNA complementar (cDNA).....	54
4.5.2.5	Etapa de amplificação por PCR, nested e seminested-PCR	55
4.5.2.5.1	Adenovírus	55
4.5.2.5.2	Rotavírus	55
4.5.2.5.3	Norovírus	56
4.5.2.6	Visualização dos produtos de nested ou seminested-PCR em gel de agarose	57
4.5.2.7	Controle de qualidade.....	57
4.5.2.8	Análise Estatística	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	59
5.2	ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS.....	63
5.3	ANÁLISES VIROLÓGICAS	71
5.3.1	<i>Detecção de vírus entéricos na água</i>	71
5.3.2	<i>Detecção de vírus entéricos no mexilhão</i>.....	77
6	CONCLUSÕES.....	80
7	RECOMENDAÇÕES.....	81
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
	PREFEITURA DE VITÓRIA.....	91
	ANEXO A – TABUA DE MARÉS NO DIA DA COLETA	95
	ANEXO B – PLANILHA DE RESULTADOS DOS PONTOS DE COLETA DE ÁGUA E DO SURURU	96

1 INTRODUÇÃO

O ambiente marinho e costeiro vêm sofrendo ao longo dos anos um processo de degradação ambiental, gerado pela pressão sobre os recursos naturais e pela capacidade limitada desses ecossistemas absorverem os impactos resultantes (GEO BRASIL, 2002).

As áreas costeiras são potencialmente afetadas pelo influxo de águas contaminadas tais como rios ou esgoto sem tratamento ou com tratamento ineficiente (RIOU et al., 2007). Assim, a deficiência de saneamento básico faz com que muitas pessoas sejam expostas, direta ou indiretamente, a efluentes. A população que vive no entorno de áreas contaminadas é especialmente afetada, já que muitos utilizam este ambiente como sua fonte de subsistência e lazer.

Outra consequência é a contaminação de mariscos, especialmente os filtradores, tais como ostras, mexilhões e vieiras, os quais podem acumular e concentrar contaminantes presentes na água, incluindo bactérias e vírus patogênicos, que acarretam em risco à saúde quando consumidos *in natura* ou mal cozidos (LEES, 2000; MUNIAN-MUJIKI et al., 2000; FORMIGA-CRUZ et al., 2005).

A contaminação microbiológica das águas costeiras para recreação, cultivo de mariscos ou outras atividades com relevância para a saúde humana é geralmente avaliada através de indicadores bacterianos de poluição fecal. Porém estes indicadores não estão necessariamente correlacionados com a presença de patógenos virais, que são mais estáveis do que as bactérias no ambiente (CALGUA et al., 2008). Evidências epidemiológicas sugerem que os vírus entéricos humanos são os agentes etiológicos mais comumente transmitidos por mariscos bivalves (LEES, 2000).

Os vírus de maior relevância, encontrados em ambientes contaminados por esgoto sanitário, são os vírus entéricos humanos. Existem mais de 140 tipos que podem infectar o homem e com habilidade para sobreviver por meses na água e no solo (OMS, 2006). Esses vírus se multiplicam no trato gastrointestinal, causam gastroenterites, e são eliminados em grandes quantidades pelas fezes ou urina (PINA et al., 1998). A diarreia causa mais de 1,5 milhão de mortes anualmente, principalmente em crianças, sendo que os vírus são os principais agentes etiológicos

da diarreia aguda em crianças (PRÜSS-ÜSTUN; CORVALÁN, 2006; ALLARD et al., 1990).

A detecção de partículas virais em amostras ambientais de água requer técnicas sensíveis, devido ao baixo número de partículas virais em grandes volumes de água. A concentração de amostras com a técnica baseada na adsorção-eluição de partículas virais, em membranas carregadas eletricamente, tem apresentado bons resultados (GILGEN et al., 1997; KATAYAMA et al., 2002; 2008). Para a detecção específica dos vírus, de forma qualitativa, a técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase - PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é geralmente utilizada, pois é sensível e capaz de detectar vírus que não crescem bem em cultura celular, além de ser mais rápida, menos custosa e trabalhosa do que as metodologia de cultivo celular (KITIGUL et al., 2005).

O monitoramento adequado da presença de patógenos no ambiente pode melhorar a qualidade das decisões a serem tomadas no âmbito de saúde pública e ambiental. Além disso, há poucos estudos sobre a contaminação viral em ecossistemas costeiros no Brasil. Assim, esta pesquisa tem a proposta de avaliar a qualidade bacteriana e viral do sistema estuarino da Baía de Vitória, através da detecção de bactérias indicadoras de contaminação de origem fecal (coliformes totais, *Escherichia coli*) e de vírus entéricos (adenovírus, norovírus e rotavírus) na água e em moluscos bioindicadores.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a qualidade microbiológica da água e de mexilhões em área de manguezal do sistema estuarino da Baía de Vitória (ES).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a qualidade microbiológica da água do sistema estuarino da Baía de Vitória através da detecção de bactérias indicadoras (Coliformes Totais e *Escherichia coli*) e de vírus entéricos (adenovírus, rotavírus e norovírus GII), em área de manguezal;
- Avaliar a qualidade microbiológica do sururu do mangue (*Mytella guyanensis*) por meio de bioindicadores de poluição fecal (Coliformes Totais e *E. coli*) e da presença de vírus entéricos (adenovírus, rotavírus e norovírus GII);
- Correlacionar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos de qualidade de água da região de estudo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O Sistema Estuarino da Baía de Vitória e o Manguezal

Um estuário é um corpo de água costeiro, semi-fechado, o qual possui uma ligação livre com o mar aberto e no interior do qual a água do mar se dilui de forma mensurável, com água doce proveniente de drenagem terrestre (PRITCHARD, 1967 apud KRAMER, 1994). Os estuários são sujeitos a flutuações intensas dos fatores ambientais como turbidez, gases dissolvidos, nutrientes, temperatura e salinidade, os quais variam na dependência das marés diárias, da vazão dos rios e da precipitação (CARMO, 1987).

Em áreas de estuário pode-se encontrar o manguezal, um ecossistema costeiro restrito aos litorais tropicais e subtropicais, que normalmente desenvolve-se na zona entre marés e localiza-se, geralmente, na desembocadura dos rios. Os manguezais estão sujeitos a inundações periódicas por água do mar ou água doce, sofrendo flutuações abruptas de salinidade (CARMO, 1987). As espécies vegetais típicas desses ecossistemas são denominadas mangue (SOFIATTI, 2006). Lugo e Snedaker (1974) consideram o ecossistema de manguezal como sistemas abertos, no que diz respeito à energia e à matéria, podendo considera-lo como a interface que liga o ecossistema terrestre ao estuarino. Através do estuário, ocorre um intenso intercâmbio de organismos, matéria orgânica e nutrientes entre o ambiente terrestre, o manguezal e o mar.

Os manguezais encontram-se distribuídos ao longo do litoral brasileiro, do extremo norte no Rio Oiapoque/Amapá (04°20'N) até a cidade de Laguna/Santa Catarina (28°30'S) (SHAEFFER-NOVELLI et al., 1994). No Espírito Santo, os manguezais aparecem desde o extremo norte até o extremo sul do Estado, com grande concentração na Baía de Vitória (CARMO et al., 1994).

A Baía de Vitória está localizada entre os municípios de Vitória, Vila Velha, Cariacica e Serra e entre as coordenadas 20°15'S – 40°22'W e 20°20'S – 40°16'W. Interliga-se com o Canal da Passagem e com a Baía do Espírito Santo, perfazendo o contorno da Ilha de Vitória (figura 1). O Canal da Passagem liga a Baía do Espírito Santo, à porção norte da Baía de Vitória, recebendo a influência da maré em suas duas

extremidades (RIGO, 2004).



Figura 1: Mapa do sistema estuarino da Baía de Vitória.

Fonte: <http://www.lamma.ufrj.br/spo/smcos/projetos/baia-espirito-santo/baia_espirito_santo.htm>

Os principais rios que deságuam na Baía de Vitória são os rios Marinho, Bubu e Santa Maria, sendo que o último é o maior e mais importante, fornecendo a maior quantidade de água doce (FERREIRA, 1989). O Rio Santa Maria da Vitória nasce na região serrana do estado e engloba os municípios de Santa Maria do Jetibá, Santa Leopoldina e parte das áreas de Cariacica, Serra e Vitória. No seu trecho final, o rio sofre influência da cunha salina e apresenta suas margens com manguezais. A embocadura do rio Santa Maria, junto a de outros rios de menor expressão, formam uma região estuarina, constituída, em sua parte central, pela Baía de Vitória. Esta pode ser considerada como parte do estuário do Rio Santa Maria da Vitória, onde a barragem submersa da Companhia Espírito Santense de Saneamento (CESAN) é o limite da intrusão salina no rio (CORREIA JUNIOR, 2003).

Os manguezais ao norte da Baía de Vitória (figura 1, em verde) ocupam uma área em torno de 2.000 ha, distribuindo-se a leste pelo município de Vitória, ao norte pelo município de Serra e a oeste pelo município de Cariacica (RIGO, 2004).

Os estuários e manguezais são considerados berçários da vida marinha, pois contém uma grande diversidade e abundância de espécies que passam ao menos uma parte de sua vida nestes ecossistemas (WILSON, 2002).

A vegetação é o traço mais típico dos manguezais (figura 2). No Brasil a formação vegetal é constituída por três gêneros (*Rhizophora*, *Avicennia*, *Laguncularia*) e 4

espécies (*R. mangle*, *L. racemosa*, *A. germinans*, *A. schaueriana*), além daqueles elementos não típicos, como *Conocarpus erecta*, *Hibiscus tiliaceus* e *Acrostichum aureus* (SHAEFFER-NOVELLI, 1987). O mangue de Vitória é constituído, predominantemente por *R. mangle*, *L. racemosa* e *A. schaueriana*, porém todas as outras espécies que ocorrem no Brasil também já foram observadas nesse mangue (CARMO, 1987).



Figura 2: Vista parcial de mangue do sistema estuarino da Baía de Vitória

A fauna dos manguezais possui espécies que passam toda a vida no manguezal, em apenas uma fase da vida ou para reprodução, desova, alimentação e abrigo. Entre aqueles animais que passam toda a vida no manguezal, o principal é o caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*) (SOFFIATI, 2006). A fauna associada encontra-se representada por espécies de valor econômico, destacando-se o molusco bivalve *Crassostrea brasiliiana* (ostra), crustáceos como o caranguejo-uçá e o siri *Callinectes danae* e peixes em número elevado quando considerados os resultados das capturas em regiões estuarinas e costeiras (SHAEFFER-NOVELLI, 1987).

Nos manguezais do Rio Santa Maria da Vitória, Carmo (1987) mostrou que a fauna associada ao bosque do manguezal da Baía de Vitória apresenta uma predominância de crustáceos decápodos e o segundo grupo quantitativamente mais rico é o de moluscos. Entre os moluscos bivalves, as ostras (*Crassostrea brasiliiana*), crescem presas às raízes e troncos das espécies vegetais típicas entre outros substratos, e os sururus (*Mytella guyanensys*) formam grandes bancos nas margens do estuário, ocorrendo também aderidos a substratos no interior do bosque do

manguezal. A prevalência de decápodos é uma característica de estuários de regiões tropicais. Carmo e outros (1994) estudaram a macrofauna bentônica de invertebrados do estuário do Rio Santa Maria da Vitória e também encontraram dominância de crustáceos decápodos. Cerca de 90% das espécies encontradas eram de siris (*Callinectes danae* e *Callinectes ornatus*) e camarões (*Penaeus aztecus subtilis* e *Penaeus brasiliensis*), sendo também encontrados moluscos, anelídeos, artrópodes, cnidários e ctenóforos.

O manguezal promove inúmeros benefícios diretos e indiretos para a população, especialmente para as populações que utilizam estes ambientes como fonte de subsistência (DIOP, 2003). O manguezal é de grande importância para cultura do estado, podendo ser citado o tanino extraído das cascas de *R. Mangle*, que é utilizado na confecção artesanal das tradicionais panelas de barro, os mariscos utilizados nas típicas moqueca e torta capixabas e o consumo habitual de caranguejo.

Contudo, ao longo dos anos, a intensa ocupação humana próxima aos manguezais, estuários e bacias de drenagem adjacentes, ocasionou diversos impactos nesses ecossistemas. Os desmatamentos ao longo do Rio Santa Maria, contribuíram para o seu assoreamento, inclusive em sua foz. As lavouras às margens desse rio e afluentes contribuíram para a contaminação deste rio e conseqüentemente da Baía de Vitória, por agrotóxicos e fertilizantes. Além disso, estes corpos d'água recebem há anos uma grande quantidade de efluentes, em sua maioria *in natura*, provenientes tanto da zona rural como também das cidades adjacentes que ali se instalaram. Outras formas de impacto foram: a destinação de lixo de origem doméstica e hospitalar em lixões construídos em áreas de aterro próximas à Baía, a exploração de madeira e tanino da vegetação do manguezal, pesca predatória e superexploração de tanino, retirado da casca de *Rhizophora mangle* (CARMO, 1987; FERREIRA, 1989; LIMA JUNIOR et al. (1994); GOLLNER, 1994).

3.2 A poluição dos corpos d'água

A poluição de corpos d'água pode ser definida como: “a adição de substâncias ou de formas de energia que, direta ou indiretamente, alterem a natureza do corpo d'água de maneira tal que prejudique os legítimos usos que dele são feitos” (VON SPERLING, 2005).

O esgoto é uma grande fonte de poluição, pois contém uma diversidade de poluentes, incluindo organismos patogênicos, substâncias tóxicas, metais pesados e uma variedade de outros resíduos orgânicos e inorgânicos, os quais afetam direta ou indiretamente os ecossistemas e organismos. O esgoto é o principal responsável pela descarga de resíduos no ambiente marinho (ISLAM; TANAKA, 2004). Barroso e colaboradores (2001) atribuem o lançamento de efluentes de regiões metropolitanas como principal responsável pela deterioração de suas águas.

O crescimento populacional e seu desenvolvimento associado são as principais causas de mudanças ambientais, sendo que a maior parte da população mundial vive em regiões costeiras. No Brasil, metade da população vive a não mais de 200km do mar, impactando diretamente os ambientes litorâneos. O crescimento populacional, o que é esperado principalmente na região costeira, é a principal forma de pressão que ocorre nessa região. A construção de casas em áreas de alta sensibilidade ambiental tais como mangues e estuários, e a falta de saneamento básico, degradam os ambientes naturais através da poluição orgânica, deposição de sedimentos e deterioração dos habitats naturais (GEO BRASIL, 2002).

A contaminação de águas naturais por microrganismos patogênicos é um problema mundial de saúde pública, levando a surtos de doenças de veiculação hídrica e uma alta incidência de morbidade e mortalidade. Em alguns países em desenvolvimento, a diarreia é o principal problema de saúde pública (SUBEKATI et al., 2002).

Segundo a OMS (2006) a água de má qualidade é a principal ameaça para a saúde humana. A diarreia é responsável por cerca de 2 milhões de mortes em crianças a cada ano, sendo a causa de aproximadamente 20% de todas as mortes em crianças no mundo (OMS, 2009). As gastroenterites e as doenças diarreicas afetam principalmente idosos, crianças e imunocomprometidos. Podem ser transmitidas entre pessoas, porém a presença de patógenos em mananciais, águas de recreação e áreas de crescimento de mariscos também oferecem risco para a população, pois

estes ambientes podem estar contaminados por efluentes contendo patógenos.

A gastroenterite (vômito e diarreia), otite e doenças respiratórias são mais frequentemente relatadas para a exposição a águas marinhas contaminadas (GRIFFIN et al., 2003). Na tabela 1 são mostradas as espécies de microrganismos patogênicos comumente isolados em águas costeiras recreacionais, a qual grupo de microrganismo que pertencem, a infecção que podem provocar e o tipo de água em que podem ser encontrados.

Tabela 1: Patógenos comumente isolados de águas costeiras recreacionais

Patógeno	Tipo de microrganismo	Infecção	Água
<i>Aeromonas</i> spp	Bactéria	Lesões, gastroenterite	Doce/Marinha
<i>Campylobacter</i> spp	Bactéria	Enterite	Doce/Marinha
<i>Clostridium</i> spp	Bactéria	Botulismo, tétano, gangrena gasosa, gastroenterite	Doce/Marinha
<i>Escherichia coli</i>	Bactéria	Gastroenterite	Doce/Marinha
<i>Pseudomonas</i> spp	Bactéria	Dermatite folicular, otite externa	Doce/Marinha
<i>Salmonella</i> spp	Bactéria	Gastroenterite, febre entérica	Doce/Marinha
<i>Shigella</i> spp	Bactéria	Disenteria bacilar	Doce/Marinha
<i>Staphylococcus</i> spp	Bactéria	Infecções de tecidos, bacteremia	Doce/Marinha
<i>Vibrio</i> spp	Bactéria	Cólera, lesões	Marinha/Estuarina
<i>Yersinia</i> spp	Bactéria	Gastroenterite	Doce/Marinha
<i>Giardia</i> spp	Protozoário	Gastroenterite	Doce/Marinha
<i>Cryptosporidium</i> spp	Protozoário	Gastroenterite	Doce/Marinha
<i>Candida albicans</i>	Fungo	Dermatite	Doce/Marinha
Vírus entéricos	Virus	Gastroenterite, hepatite, doenças respiratórias, miocardite, meningite asséptica	Doce/marinha

Fonte: Efstratiou, 2001; Griffin e outros, 2003 (Modificado)

Na Baía de Vitória a situação é a mesma da maioria das áreas costeiras, recebendo impacto da destinação de efluentes. Esta situação foi relatada há anos, em 1987, Carmo relatou sobre a contaminação do estuário por esgoto sanitário, agrotóxicos e pesticidas.

Correia Junior (2003) revelou uma contribuição significativa do lançamento de esgotos não tratados ao longo do rio Santa Maria, principalmente em sua zona mais baixa, devido às áreas urbanas do município de Serra que contribuem com efluentes não tratados. O despejo de efluentes no ambiente representa risco para a população, pois podem contaminar águas de recreação e de cultivo de moluscos (PINA et al., 1998).

Em 2002, Souza avaliou a contaminação pelos metais pesados cádmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), níquel (Ni), chumbo (Pb) e zinco (Zn) nos manguezais dos rios Aribiri, Santa Maria da Vitória e Bubu, localizados na região da Grande Vitória-ES, utilizando a ostra *Crassostrea rhizophorae* e o sururu *Mytella guyanensis* como bioindicadores. Foram observadas concentrações de Cr e Zn acima do limite máximo permitido (Portaria MS 685/98). As maiores concentrações de Cr, Fe, Ni, Pb e Mn foram encontradas no rio Santa Maria da Vitória e as maiores concentrações de Cu no rio Aribiri.

A contaminação fecal do Canal da Passagem, o qual liga-se à porção norte da Baía de Vitória, foi observada por Ribeiro (2002), que detectou os indicadores de contaminação fecal: coliformes termotolerantes, *E. coli* e enterococos em concentrações acima do permitido em legislação (Resolução CONAMA 274/2000), devido às contribuições dos efluentes de duas estações de tratamento de esgoto e de lançamentos difusos da população no entorno do canal.

Jesus e outros (2006) avaliaram a qualidade da carne do sururu de mangue (*Mytella guyanensis*), ostras e da água na região estuarina da Baía de Vitória – ES, através da análise dos metais: Pb, Cd, mercúrio (Hg), Cu, Arsênio (As) e Zn, de colimetria e de agrotóxicos. Neste estudo, foram encontrados teores de metais abaixo do limite estabelecido pela legislação (Portaria MS 685/98) e de agrotóxicos abaixo do limite de detecção. Por outro lado, foi possível encontrar teores de Zn acima do limite estabelecido em legislação (Portaria MS 685/98) nas ostras analisadas. Foi verificado também que na região da Ilha das Caieiras houve maior acúmulo de Zn, As e Pb, devido ao maior aporte de esgotos e efluentes provenientes de comércios na região. Estes teores de metais diminuíram em períodos de estiagem como consequência do menor aporte de material particulado e compostos lixiviados. Toda a região estudada (da foz do Rio Santa Maria até o Rio Bubu) estava contaminada

por coliformes, proveniente da carga de esgoto *in natura* lançada no sistema estuarino.

Estudos sobre a contaminação por microrganismos patogênicos na Baía de Vitória, ainda não foram realizados. É de grande importância que a água e os alimentos provenientes da região tenham sua qualidade microbiológica avaliada, visto que esta região é referência para o turismo e fonte de renda para a população local. Desta forma, a avaliação da contaminação fecal da água, através de outros microrganismos como os vírus entéricos é necessária, pois permitirá uma análise mais criteriosa da contaminação, já que estes vírus são mais resistentes no ambiente do que as bactérias e são os principais agentes etiológicos transmitidos por mariscos (LEES, 2000, LE GUYADER et al., 2000).

3.3 Avaliação da contaminação microbiológica em amostras ambientais

3.3.1 Bactérias indicadoras de contaminação fecal em ambientes marinhos

As avaliações da qualidade sanitária de águas e de mariscos têm sido realizadas através de programas de monitoramento de microrganismos indicadores. Estes são utilizados para detectar o possível risco da presença de organismos patogênicos, tanto no ambiente como nos produtos dele provenientes (EFSTRATIOU, 2001).

Segundo Bosh (1998) um bom microrganismo indicador de contaminação fecal deve: estar associado com a fonte de patógenos e ausente em áreas não poluídas, ocorrer em densidades mais elevadas do que os patógenos, ter ao menos a mesma resistência à inativação natural e artificial do que patógenos, ser detectado por procedimentos simples, rápidos e baratos, e não ser patogênico.

Os microrganismos indicadores mais frequentemente utilizados são os coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e enterococos (ORTEGA et al., 2009).

O grupo dos coliformes totais indica a ocorrência de uma microflora variada que pode ser encontrada em animais de sangue quente, solos, vegetais ou quaisquer efluentes contendo matéria orgânica. O grupo dos coliformes totais pode ser caracterizado por bactérias na forma de bastonetes gram-negativos, não formadores

de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de desenvolver na presença de sais biliares ou agentes tensoativos que fermentam a lactose com produção de ácido, gás e aldeído a 35-37 °C em 24-48 horas, oxidase-negativos e que podem apresentar atividade da enzima β -galactosidase. Um subgrupo dos coliformes totais é o dos coliformes termotolerantes, anteriormente chamado de coliformes fecais, formado por bactérias que além das características do grupo coliformes totais podem ser caracterizadas pela capacidade de fermentar a lactose, com produção de gás na temperatura de 44,5°C em 24 horas, tendo como principal representante a *Escherichia coli*, cujo hábitat exclusivo é o trato intestinal de animais homeotérmicos. A *E. coli* é encontrada em esgoto bruto ou tratado e em águas naturais e solos que tenham recebido contaminação fecal recente (LE CLERC, 2001; OMS, 1996)

Outro indicador de contaminação fecal utilizado são os enterococos, bactérias do grupo dos estreptococos fecais, pertencentes ao gênero *Enterococcus*, o qual se caracteriza pela alta tolerância às condições adversas de crescimento, tais como: capacidade de crescer na presença de 6,5% de cloreto de sódio, a pH 9,6 e nas temperaturas de 10 e 45°C. Devido à sua maior resistência às condições ambientais adversas frente ao grupo coliformes, os enterococos são mais utilizados como indicadores de contaminação fecal em água marinha (FIGUERAS et al., 1997).

Quanto as metodologias utilizadas para detecção de indicadores bacterianos em amostras ambientais, aquelas mais utilizadas para estimar sua população se baseiam na contagem de células viáveis. Estas metodologias se fundamentam na habilidade do crescimento celular em meio de cultura líquido ou sólido em meio ágar ou membrana filtrante. Estas metodologias podem ser divididas em método de tubos múltiplos, método de membrana filtrante e método do substrato definido (HOBSON; TOTHIL; TURNER, 1996; BUCKALEW et al., 2006).

A metodologia do substrato definido é baseada na hidrólise enzimática de substratos específicos. Esta metodologia é capaz de detectar coliformes totais e *E. coli* simultaneamente. Um meio utilizado nesta metodologia é o Colilert®, que utiliza dois substratos: o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) que é o alvo da enzima β -D-galactosidase, encontrada em bactérias fermentadoras de lactose como os coliformes totais, e a 4-metilumbeliferil- β -D-glucoronídeo (MUG), a qual é alvo da enzima β -D-glucuronidase, encontrada predominantemente em *E. coli*. No caso dos

coliformes totais, sua presença é indicada devido à produção de um produto de coloração amarela (o-nitrofenol). A presença de *E. coli* é indicada pela formação de um produto fluorescente (4-metilumbeliferona) (BUCKALEW, 2006). Esta técnica também é utilizada para detecção de enterococos, e o meio que pode ser utilizado é o enterolert®, baseando-se na atividade da enzima β -Glucosidase sobre o composto 4-metilumbeliferil- β -D-glucosidase produzindo metilumbeliferil, também fluorescente (ECKNER, 1998).

Embora utilizada e referenciada nas legislações e nos procedimentos padrões de análise de qualidade microbiológica de águas, a utilização de *E. coli* tem sido questionada como o principal parâmetro de qualidade microbiológica, uma vez que a sua presença nem sempre pode ser relacionada à de vírus patogênicos (PINA et al., 1994; RIGOTTO, 2003; MIAGOSTOVICH et al., 2008). Poucos programas de monitoramento avaliam a contaminação da água e dos tecidos de moluscos por vírus entéricos, pois este tipo de avaliação requer métodos mais avançados e complexos, exigindo, portanto, maiores investimentos (BOSH, 1998).

3.3.2 Vírus entéricos

Os vírus entéricos se encontram largamente disseminados no mundo e são responsáveis por diversas doenças que afetam o ser humano, tais como gastroenterites, meningites, miocardites e hepatites infecciosas (LEES, 2000). Entre os vírus entéricos mais importantes, transmitidos pela água, moluscos bivalves e outros alimentos ao homem, estão os norovírus, rotavírus, adenovírus, astrovírus enterovírus e os vírus da hepatite A e E (LEES, 2000).

3.3.2.1 Adenovírus Humano

Os adenovírus são vírus de DNA fita dupla, não possuem envelope e somente as proteínas do capsídeo formam a superfície externa do vírus. O capsídeo possui simetria icosaédrica, e é formado por 252 capsômeros. Destes, 240 hexons formam as faces do icosaedro e 12 pentons formam os vértices. O penton consiste em duas

estruturas distintas: a base e a fibra. A camada que envolve o vírion é denominada core (figura 3). Possuem diâmetro de 70-80nm. (ALBERTS, 1997; SANTOS, 2002).

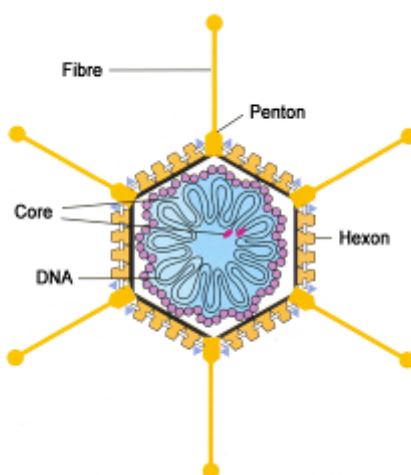


Figura 3: Partícula de Adenovírus. Localização de proteínas e material genético.
Fonte: <http://biomarker.cdc.go.kr:8080/pathogenimg/Adenovirus_en.gif>

Os adenovírus humanos compreendem 51 sorotipos, classificados na família *Adenoviridae*, gênero *Mastadenovirus* e são divididos em seis espécies, de A a F (DE JONG et al., 1999). Dos 51 sorotipos, são associados à gastroenterite infantil os sorotipos 1, 7, 12, 28, 31, 40 e 41, dos quais os sorotipos 40 e 41 possuem grande estabilidade à ação de agentes físicos e químicos, possibilitando uma permanência prolongada no meio ambiente (ENRIQUEZ, 1995).

O adenovírus é excretado pelas fezes e pela urina e é o vírus mais abundante no esgoto do que qualquer outro tipo de vírus entérico (METCALF et al., 1995). Um grande número de partículas virais, cerca de 10^{11} partículas por grama de fezes são excretados no pico da infecção aguda (CHAMPSUR, H., 1989 apud CASTIGNOLLES 1998). Por isso, um grande número de adenovírus pode estar presentes em água contaminada com esgoto, causando doenças no mundo inteiro durante todo o ano (CASTIGNOLLES et al., 1998).

Os adenovírus são responsáveis por grande parte das infecções respiratórias e da conjuntiva em seres humanos, além disso, podem causar paralisia, meningite, miocardite, anomalias congênitas no coração e gastroenterite (PINA et al., 1998; ABBASZADEGAN et al., 1993; KO et al., 2005). Alguns sorotipos apresentam potencial oncogênico. Em geral, as infecções por adenovírus são de fácil cura, mas podem ser fatais em pacientes imunocomprometidos, nos quais podem causar infecções generalizadas (HIERHOLZER, 1992). A maioria das infecções por

adenovírus ocorrem em crianças menores de 2 anos de idade e mostram pouca variação sazonal além de estarem associados a surtos de gastroenterites em berçários e hospitais (UHNOO et al., 1984; ALLARD et al., 1990). Os adenovírus entéricos são responsáveis por causar cerca de 10% das gastroenterites infantis (LEES, 2000). Podem infectar uma grande variedade de animais, porém não são considerados vírus com potencial zoonótico (SANTOS, 2002).

A transmissão pode ocorrer por contato direto ou indireto (por meio de aerossóis), com secreções oculares e respiratórias e por via fecal-oral. O período de incubação varia de 3 a 10 dias, sendo o maior dentre todos os vírus entéricos. Alguns sorotipos são capazes de estabelecer infecções assintomáticas e continuar sendo excretados pelas fezes por meses e até anos (SANTOS, 2002).

3.3.2.2 *Rotavírus*

Os rotavírus são vírus não envelopados, medem de 70 a 80nm e possuem três proteínas do capsídeo organizadas de forma icosaédrica e concêntrica envolvendo o genoma, que é formado por 11 segmentos de RNA dupla fita. As proteínas sintetizadas são de dois tipos: as estruturais (VP) que compõem o vírus, e as não-estruturais (NSP), sintetizadas dentro das células infectadas (GLASS, 2006).

Estes vírus possuem três capsídios distintos: o mais interno é constituído pela proteína VP2 e no interior da partícula estão presentes as proteínas VP1, VP3 e o genoma viral (figura 4). Esta partícula é então circundada pelo capsídeo intermediário, formado por proteína VP6, a mais prevalente. O capsídeo mais externo é constituído por duas proteínas: VP4 (protease sensível ou proteína P) e VP7 (glicoproteína ou proteína G), que são imunogênicas e, portanto, são responsáveis pela indução de uma resposta imune protetora (MATTION; COHEN; ESTES, 1994).

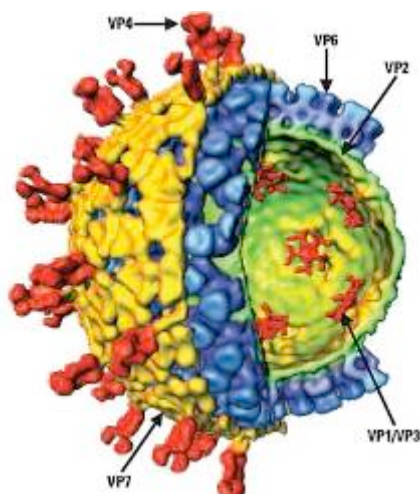


Figura 4: Partícula de rotavírus. Localização de proteínas e visualização tridimensional.
 Fonte: <<http://www.iavireport.org/Issues/Issue10-5/Figure2.jpg>>

Os rotavírus são classificados em 7 grupos (A a G), sendo que os grupos A, B e C de rotavírus são reconhecidos por causarem doenças em seres humanos. O grupo A é o mais importante na patologia humana e está associado a quadros graves de gastroenterites em crianças e lactentes. Os grupos B e C são responsabilizados por surtos de gastroenterites em crianças e adultos. Todos os sete grupos infectam uma variedade de animais, sendo já evidenciado o potencial zoonótico do rotavírus (ESTES; COHEN, 1989). Essas características, associadas à sua reconhecida estabilidade diante das variações de temperatura e pH e de substâncias químicas, são os determinantes da elevada infecciosidade dos rotavírus.

O rotavírus é transmitido através de alimentos e água contaminados e também pelo contato direto com pessoas infectadas. O período de incubação é relativamente curto, varia de um a três dias. Os rotavírus são os maiores causadores de diarreia e gastroenterite infantil em clima temperado e afetam crianças de todas as classes sociais no mundo inteiro. Algumas apresentam sintomatologia leve mas em outras, a infecção pode se tornar grave levando à desidratação e até mesmo à morte. Os rotavírus também são associados a surtos de gastroenterites em ambientes fechados, como creches, enfermarias pediátricas e núcleos geriátricos. Os principais sintomas são febre, vômitos e diarreia frequente (LOURENÇO et al., 1985).

Estima-se que o rotavírus seja responsável por um terço de todas as hospitalizações causadas por diarreia. Em países desenvolvidos, o índice de mortalidade é menor do que nos países em desenvolvimento, mas a infecção ocorre virtualmente em todas as crianças com menos de cinco anos de idade (COOK, 1990 apud

O'HALLORAN, 2000). Segundo a OMS (2000), morrem anualmente 600 mil crianças no mundo, com menos de 5 anos, vítimas do rotavírus.

3.3.2.3 Norovírus

Os norovírus pertencem à família *Caliciviridae* e foram previamente chamados de *Norwalk-like vírus* e *Small Round Structured Viruses* (SRSV) devido sua morfologia (figura 5). Possuem uma estrutura simples consistindo de um capsídeo e ácido nucléico. Não são envelopados e nem cultiváveis. Medem entre 27 e 30nm. O genoma consiste de fita simples de RNA organizada em três “quadros abertos de leitura” (*open reading frames* – ORF) no qual ORF1 codifica proteínas não estruturais, ORF2 codifica a principal proteína estrutural (VP1) e ORF3 codifica uma proteína pequena do capsídeo associada à estabilidade de VP1. O genoma completo compreende aproximadamente 7.5 kb (ATMAR, ESTES, 2006).

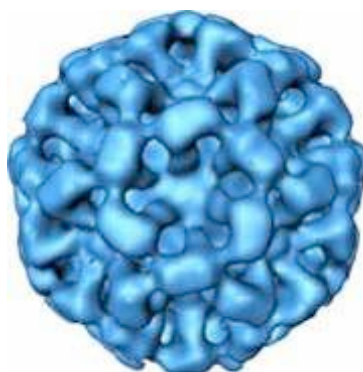


Figura 5: Partícula de norovírus.

Fonte: <<http://www.wddty.com/03363800371727948775/Norovirus.jpg>>

Os norovírus podem ser divididos em dois genogrupos (GI e GII) os quais incluem múltiplos genótipos (GALLIMORE et al., 2005). Um terceiro genogrupo possível já foi descrito (VINJÉ et al., 2004). O Genogrupo II é detectado mais frequentemente do que GI em todo o mundo (UEKI et al, 2005).

Os norovírus são responsáveis por surtos de gastroenterite aguda usualmente em comunidades semi-confinadas tais como hospitais, cruzeiros marítimos e casas de repouso (GALLIMORE et al., 2005; KUMAZAKI, USUKU; NOGUSHI, 2007).

Os norovírus são considerados os principais agentes causais de gastroenterite não bacteriana e a causa mais comum de gastroenterites em pessoas de todas as faixas etárias (KOJIMA, 2002). Os norovírus podem ser transmitidos por via fecal-oral, de pessoa para pessoa, mas também via alimentos, água e superfícies contaminados. A manifestação clínica do norovírus é leve. Infecções assintomáticas são comuns e podem contribuir com a disseminação da infecção. A incidência em crianças é elevada mas também ocorre regularmente em adultos (KOOPMANS; DUIZIER, 2004).

Os norovírus inicialmente foram detectados, por meio de técnicas moleculares, em fezes (KOJIMA et al., 2002; SUBEKATI, 2002; RICHARDS et al., 2004, SOARES, 2007). Atualmente são detectados em vários tipos de ambientes tais como: água potável (GILGEN et al., 1997; HARAMOTO et al., 2004), água marinha (KATAYAMA et al., 2002), água subterrânea (FOOT et al., 2003), esgoto (LOODER; RODA HUSMAN, 2005) e mariscos (BOXMAN et al., 2006, GUYADER et al., 2006).

Surtos de gastroenterites causadas por norovírus têm sido associados com água potável e água de recreação contaminada com material fecal (LOODER et al., 1999). Ueki e outros (2005) detectaram norovírus em fezes de pacientes com gastroenterite aguda, esgoto sanitário, água residuária tratada, água de rio e ostras cultivadas.

3.3.2.4 Métodos de detecção de vírus em ambientes aquáticos e em mariscos

A detecção dos vírus em ambientes aquáticos depende de métodos que sejam capazes de detectar pequenas quantidades de partículas virais em grandes volumes de água. De acordo com Bosh (1998) um bom método de concentração deve possuir a maioria dos seguintes critérios: ser uma técnica simples, possuir alta taxa de recuperação de partículas virais, produzir um concentrado de pequeno volume e não ser muito caro.

As metodologias desenvolvidas para a concentração de vírus em amostras ambientais baseiam-se em algumas características observadas em partículas virais tais como sua polaridade, que possibilita sua adsorção em uma variedade de matrizes e seu peso molecular, que permite a concentração por técnicas de ultrafiltração ou ultracentrifugação (JONES; SELLWOOD, 2001).

As etapas básicas necessárias à detecção de partículas virais em amostras de água e de mariscos consistem na concentração da amostra ou eluição do tecido do marisco, seguido de concentração e detecção específica dos vírus.

A metodologia de adsorção/eluição é largamente utilizada na concentração de amostras de água de diversos ambientes e geralmente necessita de um segundo estágio de concentração. Esta metodologia envolve duas etapas principais: a adsorção em um substrato e sua eluição por uma solução. O substrato pode ser uma membrana negativamente carregada (SOBSEY; JONES, 1979; ABBASZADEGAN et al., 1993; PINA et al., 1994), uma membrana positivamente carregada (STEINMANN, 1980), lâ de vidro (PUIG et al., 1994) entre outros.

Os métodos desenvolvidos para eluição de partículas virais do tecido do molusco envolvem uma combinação de etapas consecutivas a fim de separar e depois eluir os vírus dos tecidos dos moluscos, concentrando-os em pequenos volumes, passíveis de serem processados para identificação viral (LEWIS & METCALF, 1988; PINA et al., 1998; LE GUYADER, 2000).

Após a etapa de concentração e eluição, métodos sensíveis de detecção viral devem ser utilizados. A utilização de técnicas moleculares como a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) na identificação do genoma viral de amostras de moluscos bivalves, assim como de amostras ambientais de água é cada vez mais comum (PINA et al., 1998; TRAORE et al., 1998; QUEIROZ et al., 2001; BEURET et al., 2003; BOXMAN et al., 2006; KATAYAMA et al., 2008).

A PCR consiste em um método *in vitro* de amplificação enzimática de seqüências específicas de DNA. Assim, poucas cópias de DNA marcado podem ser amplificadas a um nível detectável (ALBERTS et al., 1997).

A capacidade da PCR em produzir grandes números de cópias de uma seqüência específica do DNA proporciona uma detecção rápida, sensível e específica, dos microorganismos de ambientes aquáticos. Porém, após a concentração da amostra, há um concentrado contendo vírus assim como substâncias orgânicas e sólidos dissolvidos, estes últimos podem interferir na atividade da DNA polimerase, principalmente ácidos húmicos. Por isso, estas substâncias devem ser removidas antes da PCR (ABBASZADEGAN et al., 1993). A utilização da PCR é muito

importante para vírus que não são bem cultivados em culturas celulares tais como os adenovírus entéricos e norovírus.

Algumas variações desta técnica já são amplamente empregadas na detecção de vírus em diversos ambientes, tais como RT-PCR, utilizada para conversão de RNA em DNA complementar antes da etapa de amplificação permitindo o estudo de vírus de RNA por exemplo; multiplex-PCR para detecção de múltiplas seqüências alvo numa mesma amostra; nested-PCR, que utiliza uma segunda etapa de amplificação com um par de iniciadores internos aos utilizados na primeira etapa, permitindo maior sensibilidade e especificidade, como em amostras ambientais pouco concentradas e, mais recentemente, a PCR em tempo real, utilizada para quantificar o DNA alvo presente na amostra (PINA et al., 1998; FORMIGA-CRUZ et al., CALGUA et al., 2008).

3.4 A contaminação de moluscos bivalves

Os moluscos bivalves são animais filtradores, ou seja, alimentam-se concentrando e acumulando partículas da água (BARNES; RUPPERT, 1996). Muitas espécies vivem em ambientes calmos, onde os níveis de nutrientes são elevados e frequentemente encontram-se contaminados por efluentes domésticos (LEES, 2000). O consumo destes moluscos pode representar um risco à saúde, uma vez que, as partículas retidas por estes organismos podem conter bactérias, protozoários, helmintos e vírus (CROCI et al., 2000; POMMEPUY et al., 2006) além de contaminantes químicos tais como metais pesados, organoclorados e elementos radioativos (BØRRETZEN; SALBU, 2009). Por esta razão, esses organismos podem ser utilizados como bioindicadores da qualidade da água em que vivem. As diferentes partículas que podem ser bioacumuladas nesses organismos são encontradas principalmente nas glândulas digestivas (MUNIAN-MUJICA et al., 2002, WANG et al., 2008) e brânquias (HERNROTH; ALLARD, 2007).

Entre os patógenos que podem ser bioacumulados, os vírus são considerados os principais agentes etiológicos transmitidos por moluscos bivalves (LEES, 2000). Por isso, a detecção de vírus em moluscos bivalves, a fim de avaliar sua qualidade microbiológica, é recomendada, pois as bactérias indicadoras, normalmente utilizadas para esta finalidade, nem sempre podem ser relacionadas com a presença

dos vírus, que também são mais persistentes e estáveis do que bactérias (PINA et al., 1998; LEES, 2000).

Os vírus humanos transmitidos via fecal-oral foram associados a moluscos tanto pelo isolamento de vírus provenientes de amostras de moluscos quanto pela evidência de infecções associadas ao seu consumo. Os vírus que podem estar associados a moluscos bivalves são: norovírus (NENONEM et al., 2008), o qual é reconhecido como a principal causa de gastroenterite por mariscos, vírus da hepatite A (LEWIS, METCALF, 1988; MULLENDRE et al., 2001), rotavírus (BOSH et al., 1994), adenovírus (KARAMOKO et al., 2005), astrovírus (RIOU et al., 2007) e enterovírus (MUNIAIN-MUJIKA, 2000).

A maioria dos moluscos bivalves é capaz de bioacumular de 3 a 100 vezes mais partículas virais em relação à concentração destas partículas nas águas circundantes (JAYKUS et al., 1993 apud LENOCH et al., 2003).

Bosh e colaboradores (1994) verificaram que após 6h de imersão do mexilhão comum (*Mytilus spp*) em água marinha contendo de 8×10^5 a 2.5×10^7 partículas de adenovírus e rotavírus por litro, entre 25 e 35% dos vírus inoculados foram absorvidos pelos tecidos do molusco, principalmente trato digestivo e brânquias.

Nishida e outros (2003) encontraram mais de 100 cópias do genoma de norovírus em 11 de 17 ostras positivas para a presença deste vírus, sendo que a dose infecciosa para este vírus é menor do que 10 cópias (MOE et al., 2002 apud POMMEMPUY et al., 2006), apesar de não ter sido possível saber se eram todos infecciosos.

Diversos trabalhos têm sido realizados em todo o mundo ao longo dos anos a fim de verificar a contaminação viral em moluscos (tabela 2).

Tabela 2: Resultados obtidos por pesquisadores em diferentes países ao longo dos anos

Ano/Autor/Local	Resultados obtidos
1994 Bosh e outros Espanha	Detecção de Vírus da Hepatite A e rotavírus em 40% e 56% das amostras de moluscos analisadas, respectivamente.
1998 Pina e outros Espanha	Detecção de enterovírus, vírus da hepatite A e adenovírus em mexilhões.
1999 Green; Lewis Nova Zelândia	Detecção de vírus da hepatite A, enterovírus e rotavírus em ostras, águas residuárias e sedimento.
2005 Logullo Brasil	Detecção de vírus da hepatite A em amostras de ostras.
2005 Karamoko e outros Marrocos	Detecção de adenovírus em mexilhões provenientes de áreas de cultivo.
2006 Boxman e outros Europa -diversos países	Detecção de norovírus em mexilhões e ostras provenientes de áreas de cultivo, após surto de norovírus associado ao consumo destes moluscos. Houve correlação entre o genótipo encontrado em pacientes com aqueles encontrados no ambiente.
2007 Nishida e outros Japão	Detecção de norovírus em aproximadamente 5% de ostras para consumo sem cozimento, sendo que os norovírus detectados eram geneticamente relacionados aos de humanos.
2008 Nenonem e outros Suécia	Detecção de norovírus em mexilhões de locais próximos a descarga de efluentes, com bioacumulação de genótipos de norovírus de origem humana nos mexilhões, concluído diante da similaridade elevada (99.9%) entre os genótipos detectados em mexilhões e em humanos.
2008 Umesha e outros Índia	Detecção de adenovírus em 17% das amostras de ostras e de enterovírus em 37%. Não foi detectado norovírus ou vírus da hepatite A. Os períodos de maior ocorrência de amostras positivas foram nos meses em de maior precipitação.

Em muitos países, um meio utilizado para diminuir a contaminação microbiológica da carne do molusco, principalmente aqueles consumidos crus, e torná-la aceitável, conforme a legislação, é através do processo de depuração. Entretanto, vírus entéricos são mais resistentes à depuração do que as bactérias (LEES, 2000).

Analisando um processo de depuração que pudesse ser eficaz para remoção de vírus entéricos, Bosch e colaboradores (1994) verificaram o processo de depuração em mexilhões contaminados em laboratório com Vírus da Hepatite A, rotavírus,

adenovirus entérico e enterovírus, em fluxo contínuo de água marinha ozonizada, obtendo 74.0-99.7%, 93.8-99.8% e 97.0-100% de remoção dos tecidos do mexilhão após 20, 48 e 96h, respectivamente. Após análise de risco calculada, os autores sugerem que os mexilhões deveriam ser purificados antes do consumo para reduzir substancialmente o risco de infecção por vírus entéricos.

Munian-Mujika e outros (2002) avaliaram a depuração de mexilhões em tanques de água marinha, desinfetadas com irradiação UV e ozônio que passavam por um *skimmer* e por um filtro biológico. Conforme resultados obtidos, os autores sugeriram cerca de 5 dias de depuração nesse sistema, para o consumo de ostras cruas, a fim de garantir a segurança bacteriana e viral deste molusco. Foi observado que, após esse período, todas as amostras foram negativas para vírus humanos detectados por PCR. O processo de depuração é custoso e pode diminuir o sabor do molusco, por isso, o ideal é que haja empenho na conservação e utilização sustentável de ambientes costeiros e acesso ao saneamento.

3.5 Legislação referente à qualidade de água e de moluscos

Os constantes impactos no ecossistema costeiro tornam necessária a adoção de medidas que garantam a qualidade das águas e dos alimentos provenientes dessas áreas, a fim de garantir a saúde da população.

3.5.1 Águas

A preocupação com o uso sustentável dos recursos costeiros, a ordenação da ocupação de espaços litorâneos e a adoção de medidas necessárias para a gestão de áreas costeiras foi regulamentada desde 1988, quando foi instituído o Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro (PNGC) através da Lei 7661/88, sendo em 1997 revisado, pela Resolução nº 05/97 (PNGC II). Os detalhamentos e operacionalização dessa Lei foram objeto da Resolução nº 01/90 da CIRM (Comissão Interministerial para os Recursos do Mar). A própria Lei já previa mecanismos de atualização do PNGC, por meio do grupo de Coordenação do Gerenciamento Costeiro (COGERCO). No período compreendido entre o PNGC I e

o PNGC II importantes realizações puderam ser constatadas, como a efetivação do processo de zoneamento costeiro, a criação e o fortalecimento de equipes institucionais nos Estados e o aumento da consciência da população em relação aos problemas da Zona Costeira (BRASIL, 1997).

Um ecossistema costeiro, que sempre foi alvo de degradação ambiental ao longo dos anos, é o manguezal, protegido por legislação no Brasil. Conforme a resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente - CONAMA 04/85, o manguezal é considerado uma área de preservação permanente (BRASIL, 1985). Nesse sentido, em 1986, a Prefeitura de Vitória/ES, criou a Reserva Biológica Municipal Ilha do Lameirão (Lei 3326/86) sendo posteriormente transformada em Estação Ecológica Ilha do Lameirão (Lei 3377/86), a fim de preservar e proteger ecossistemas e recursos naturais ao norte da Baía de Vitória (PREFEITURA DE VITÓRIA, 1986).

As águas de ecossistemas costeiros também necessitam de regulamentação, pois são alvo de degradação ambiental, principalmente pelo lançamento de resíduos líquidos e sólidos diretamente ou indiretamente pelos rios contaminados que ali deságuam. Por isso, a fim de garantir a qualidade da água desses ambientes para os diversos usos pela população, foi instituída no Brasil a resolução CONAMA 357/2005, que classifica os corpos d'água conforme seus usos preponderantes e estabelece as diretrizes ambientais para seu enquadramento através da determinação das condições e padrões microbiológicos, físicos e químicos. Essa resolução considera "a classificação das águas doces, salobras e salinas essencial à defesa de seus níveis de qualidade de modo a assegurar seus usos preponderantes", e que "o enquadramento dos corpos de água deve estar baseado não necessariamente no seu estado atual, mas nos níveis de qualidade que deveriam possuir para atender às necessidades da comunidade" (BRASIL, 2005). Conforme essa legislação, águas salobras que entre os usos estejam a recreação de contato primário, pesca entre outros, como o sistema estuarino da Baía de Vitória, há possibilidade de serem classificadas como classe 1. Quanto ao parâmetro microbiológico estabelecido para esta classe, em usos que não sejam cultivo de moluscos bivalves ou recreação, não deverá ser excedido o limite (tabela 3) em 80% ou mais de pelo menos 6 amostras coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. A *E. coli* poderá ser determinada em substituição ao

parâmetro coliformes termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

Considerando as águas que são destinadas à recreação, a resolução CONAMA 274/2000 dispõe sobre a qualidade requerida para águas com tal finalidade. Assim, essas águas podem ser definidas como próprias (excelente, muito boa, satisfatória) quando em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das semanas anteriores, colhidas no mesmo local, houver, no máximo, os valores estabelecidos (tabela 3) pela legislação para coliformes termotolerantes, *E. coli* ou enterococos, sendo que quando for utilizado mais de um indicador microbiológico, as águas terão as suas condições avaliadas de acordo com o critério mais restritivo (BRASIL, 2000). As águas serão classificadas como impróprias, quando, entre outras determinações, o valor obtido na última amostragem for superior aos valores estabelecidos na tabela 3, sendo recomendada a pesquisa de organismos patogênicos. Porém, indicadores virais ainda não foram incluídos.

As principais normas internacionais que regem a qualidade requerida para águas recreacionais podem ser representadas pelas legislações americana e europeia. Nos Estados Unidos, o *Ambient Water Quality Criteria for Bacteria* (USEPA, 1986), estabelece o limite bacteriológico em águas marinhas para recreação de contato primário e na Europa, a Diretiva 2006/7/CE, estabelece as concentrações bacteriológicas permitidas para águas de recreação de contato primário (CEE, 2006). O limite estabelecido pela norma americana para água marinha (tabela 3), baseia-se na média geométrica de um número de amostras estatisticamente suficiente, geralmente não menos do que 5 amostras igualmente espaçadas por um período de 30 dias. A norma europeia, assim como a legislação brasileira, estabelece classes de qualidade da água e adota mais de um parâmetro para cada uma delas (tabela 3). Os valores apresentados são aqueles estabelecidos para águas costeiras e de transição. Os valores para as contagens microbiológicas baseiam-se no conjunto de dados recolhidos sobre a qualidade das águas balneares para o último período de avaliação, devendo consistir sempre em, pelo menos, 16 amostras.

Uma síntese dos parâmetros microbiológicos e dos valores adotados pelas legislações citadas anteriormente pode ser visualizada na tabela 3. Foram considerados os parâmetros relativos à água salobra ou salina.

Tabela 3: Normas relativas ao limites microbiológicos para avaliação de águas recreacionais

Norma	Especificações		
	Coliformes termotolerantes/100mL	<i>E. coli</i> /100mL	Enterococos/100mL
CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005)	<1000 (p80)	<1000 (p80)	NA
	p(80)	p(80)	p(80)
CONAMA 274/2000 (BRASIL, 2000)	Excelente: <250 Muito boa: <500 Satisfatória: <1000 Imprópria: <2500	<200 <400 <800 <2000	<25 <50 <100 <400
USEPA (1986)	NA	NA	<35
Diretiva 2006/7/CE (CEE, 2006)	Excelente: <250 Bom: <500 (p90) Suficiente: <500 (p95)	NA	NA

NA – Não Aplicável; p – percentil

3.5.2 Moluscos Bivalves

A qualidade microbiológica da carne de moluscos bivalves é abordada em legislações que ou avaliam a sua carne ou a água de cultivo/extração.

No Brasil, a resolução CONAMA 357/05 define os parâmetros necessários para águas de cultivo de moluscos bivalves destinados à alimentação humana.

Outra legislação brasileira é a resolução RDC 12/2001, que aprovou o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, revogando a Portaria SVS/MS 451 de 19 de setembro de 1997. Esta legislação visa compatibilizar a legislação nacional com regulamentos harmonizados no Mercosul, relacionados aos critérios e padrões microbiológicos para alimentos. Esta resolução visa definir padrões microbiológicos para alimentos em geral, e é a única com algum critério microbiológico estabelecido para moluscos (BRASIL, 2001).

Com a finalidade de estabelecer e avaliar os requisitos necessários para garantia da qualidade higiênico-sanitária dos moluscos bivalves, visando à proteção da saúde da população e à criação de mecanismos seguros para o comércio nacional e internacional destes animais, em 2005, o Decreto 5564 instituiu o Comitê Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves – CNCMB (BRASIL, 2005b)

Em âmbito internacional, as principais legislações referentes a qualidade de

moluscos são a europeia e a americana. Na Europa, a Diretiva 91/492/CE, estabelece as normas sanitárias que regem a produção e a colocação no mercado de moluscos bivalves vivos. Há um sistema de classes de água de cultivo (A, B, C e proibido) sendo que apenas na classe A os moluscos podem ser coletados e comercializados para consumo humano direto. Se o limite estabelecido for ultrapassado, o mexilhão deve ser submetido à depuração. Se a área for classificada como proibida, não podem ser comercializados moluscos provenientes destas áreas, nem mesmo é permitido que haja depuração. Devido aos surtos de doenças provocadas por vírus entéricos devido ao consumo de moluscos bivalves contaminados, essa legislação demonstrou preocupação com a presença destes patógenos em moluscos, estabelecendo que, na falta de técnicas de rotina para a pesquisa de vírus e de fixação de normas virológicas, o controle sanitário baseia-se na contagem de bactérias de origem fecal. Em 1999, através da Decisão do Conselho 1999/313/CE, o Conselho da União Europeia designou que os países membros deveriam ter um laboratório nacional de referencia para o controle das contaminações bacterianas e virais dos moluscos bivalves (CEE, 1999).

Nos Estados Unidos, em 2003, a FDA (Food and Drug Administration) divulgou o *National Shellfish Sanitation Program*, um guia para o controle do crescimento, processamento e transporte de moluscos. Os critérios utilizados para o controle de áreas de extração/cultivo/depuração de moluscos bivalves, baseado em densidade bacteriológica, são divididos em categorias: aprovado, condicionalmente aprovado, condicionalmente restrita, restrita e proibido. As áreas avaliadas como condicionalmente aprovadas e condicionalmente restritas, necessitam de um plano de manejo para adequarem-se às normas exigidas para a produção de moluscos. A produção de moluscos provenientes de áreas classificadas como restritas, deve obrigatoriamente, como na legislação da União Europeia, passar por um sistema de purificação ou ser transportada para áreas de qualidade microbiológica superior, previamente à sua introdução no mercado.

Uma síntese dos parâmetros microbiológicos adotados pelas legislações citadas anteriormente pode ser visualizada na tabela 4. Os valores expressos são relativos a média geométrica de um número de amostras e determinações específicos para cada legislação.

Tabela 4: Normas relativas ao limites microbiológicos para avaliação da qualidade microbiológica de moluscos bivalves

Norma	Especificações		
	Coliformes Totais	Coliformes termotolerantes	<i>E. coli</i>
<i>Legislações baseadas na água de cultivo (100mL)</i>			
CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005)	NA	<43 ou <88 (p90)	NA
NSSP/FDA (FDA, 2003)	Aprovada: <70	<14	NA
	Restrita: <700	<88	
	Proibida: >700	>88	
<i>Legislações baseadas na carne do molusco (100g)</i>			
RDC 12/2001* (BRASIL, 2001)	NA	5000	NA
Diretiva 91/492/CEE (CEE, 1991)	NA	Classe A: <300	<230
		Classe B: <6.000 (p90)	<4600 (p90)
		Classe C: <60.000	NA

p - percentil

NA – Não Aplicável

*Esta resolução apresenta o valor para 1g de carne cozida (50 Ct/g), que foi alterado para 100g para comparação com a legislação europeia.

A maioria das legislações citadas utiliza, como parâmetro microbiológico, bactérias indicadoras de contaminação fecal, como coliformes totais, termotolerantes, *E. coli* e enterococos, porém indícios de preocupação com patógenos que não podem ser associados a tais bactérias tem sido revelados. Bosh e outros (1994) detectaram Vírus da Hepatite A e rotavírus de amostras de moluscos provenientes de áreas que, de acordo com critérios bacteriológicos de qualidade, poderiam ser classificados como não poluídas, seguras para natação e adequadas para coleta de mexilhões. Assim, é importante que sejam desenvolvidas e aperfeiçoadas metodologias que visem à detecção desses patógenos, para que seja possível incluir novos parâmetros na legislação que dêem maior segurança para a saúde da população.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no estuário adjacente à região da grande São Pedro em Vitória – ES (região VII, figura 6) e constituiu-se das seguintes etapas: (1) coleta de amostras de água e sururu em 3 pontos do sistema estuarino da Baía de Vitória e (2) monitoramento da contaminação fecal da água e do sururu através da detecção das bactérias indicadoras pelo método de substrato definido cromofluorogênico e de vírus entéricos através da amplificação do material genético.

A região VII está localizada na Baía noroeste de Vitória e compreende 10 bairros (Comdusa, Conquista, Ilha das Caieiras, Nova Palestina, Redenção, Resistência, São José, Santo André, São Pedro e Santos Reis), numa área aproximada de 3.600.782 m² (PREFEITURA DE VITÓRIA, 2009).



Figura 6: Mapa do município de Vitória, destacando a região mais próxima a parte do sistema estuarino estudado
(FONTE: <<http://www.vitoria.es.gov.br/regionais/principal/reg7.asp>>)

As coletas de água no estuário foram realizadas em três pontos, georreferenciados utilizando GPS 76 Garmin (Tabela 5; Figura 7). Estes pontos foram selecionados de acordo com resultados de estudos anteriores desenvolvidos na região e com o auxílio de dois pescadores da região. A distância aproximada entre os pontos pode ser visualizada na tabela 6.

Tabela 5: Pontos de Amostragem

Ponto	Descrição	Coordenadas
1	manguezal próximo a foz do rio Santa Maria da Vitória	S 20°15'641 W 40°19'960
2	Próximo a manguezal da ilha onde é coletado o sururu	S 20°16'262 W40°20'632
3	cais da Ilha das Caieiras	S 20°16'597 W 40°20'217



Figura 7: Mapa do sistema estuarino da Baía de Vitória com os pontos de amostragem deste trabalho

Tabela 6: Distâncias aproximadas entre os pontos de coleta

P1 e P2	940m
P2 e P3	1250m
P1 e P3	950m

Fonte: Geowebvitória

O acesso aos locais de coleta de água e do sururu foi realizado utilizando-se um barco a motor. O trajeto iniciou-se no cais da Ilha das Caieiras em direção ao primeiro ponto de coleta de amostra de água (P1), próximo ao Rio Santa Maria, em seguida para o segundo ponto de coleta de água (P2), onde ocorreu a coleta de

água e mexilhão, retirado das raízes das árvores encontradas no mangue mais próximo a P2, e então voltou-se para o cais que é o terceiro e último ponto de coleta de água (P3). Na figura 8 pode-se visualizar parte do sistema estuarino da Baía de Vitória e dos bairros vizinhos.



Figura 8: Vista dos pontos de coleta de água (P1, P2 e P3) e de marisco (P2) no sistema estuarino da Baía de Vitória.

4.1 Coleta amostral

Em cada ponto foi coletado 1,5 litro de amostra de água estuarina, aproximadamente 15 cm abaixo da superfície, no período matutino. Foi determinado previamente que as coletas seriam realizadas quando a maré estivesse em altura suficiente para chegar nos pontos de amostragem e que fosse possível a coleta do sururu. As coletas foram realizadas mensalmente entre os meses de fevereiro/2008 e março/2009.

Os mariscos foram coletados de forma manual, com mesmo período e frequência das amostras de água.

4.2 Armazenamento e transporte

As amostras de água e de marisco foram armazenadas em caixa térmica sob refrigeração logo após sua coleta, e assim foram transportadas para o Laboratório de Saneamento para posterior análise. As amostras que não foram processadas no momento em que chegaram no laboratório, foram mantidas em refrigerador a 4°C, por no máximo 2 horas.

4.3 Análises laboratoriais

Todas as análises e medições foram realizadas no Laboratório de Saneamento (LABSAN), Departamento de Engenharia Ambiental (DEA), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

4.4 Análises físico-químicas das amostras de água

As análises físico-químicas realizadas na água foram as seguintes: pH, condutividade, turbidez e sólidos dissolvidos.

As medições de pH foram realizadas utilizando pHmetro de bancada (MPA-210, eletrodo Analion), as de Condutividade foram realizadas utilizando Condutivímetro (Jenco electronics, 1671) e as análises de turbidez foram realizadas com turbidímetro microprocessado (Alfakit). As análises de Sólidos Dissolvidos Totais (SDT) foram realizadas de acordo com as recomendações do Standard Methods for Water and Wastewater (APHA; AWA; WEF, 2005).

Tabela 7: Resumo das metodologias de análises físico-químicas

Parâmetro	Metodologia	Referência
pH	Método eletrométrico	APHA; AWA; WEF, 1995 (4500 H ⁺)
Condutividade elétrica	Método potenciométrico	APHA; AWA; WEF, 1995 (2510)
Turbidez	Método nefelométrico	APHA; AWA; WEF, 1995 (2130)
SDT	Método gravimétrico	APHA; AWA; WEF, 1995 (2540)

4.5 Análises microbiológicas realizadas nas amostras de água e do mexilhão

4.5.1 Bactérias

Os testes para detecção e quantificação de Coliformes Totais e *Escherichia coli* foram realizados através da metodologia de substrato definido através do sistema de de cartelas (figura 9), que é um método de quantificação semi-automático embasado no modelo de Número Mais Provável (NMP) (APHA, 1995). Cem mililitros da amostra diluída (10mL da amostra em 90mL de água de diluição), conforme o necessário para cada amostra, foram homogeneizados ao meio contendo o substrato definido. Este volume foi transferido para a cartela Quanti-Tray® (IDEXX) de 97 cavidades (figura 9), que foi selada em seladora Quanti-Tray. As cartelas foram incubadas a 35,5°C por 24h. Os resultados foram considerados positivos para Coliformes Totais quando o conteúdo das cavidades possuíam coloração amarela à luz ambiente e para *E. coli* quando os poços apresentavam fluorescência sob luz UV (figura 9). Os números de cavidades positivas foram convertidos ao NMP através da tabela de conversão fornecida pelo fabricante. Para as amostras dos tecidos dos mariscos coletados, foram utilizados 25g da carne de sururu, homogeneizados com auxílio de um mixer (Walita) em 225mL de água de diluição. As diluições posteriores foram realizadas utilizando-se 10mL da amostra diluída em 90mL de água de diluição. As etapas posteriores foram as mesmas realizadas para as amostras de água.

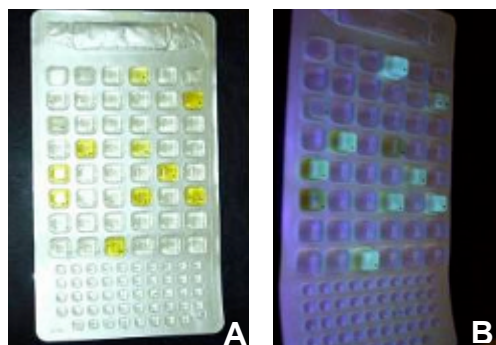
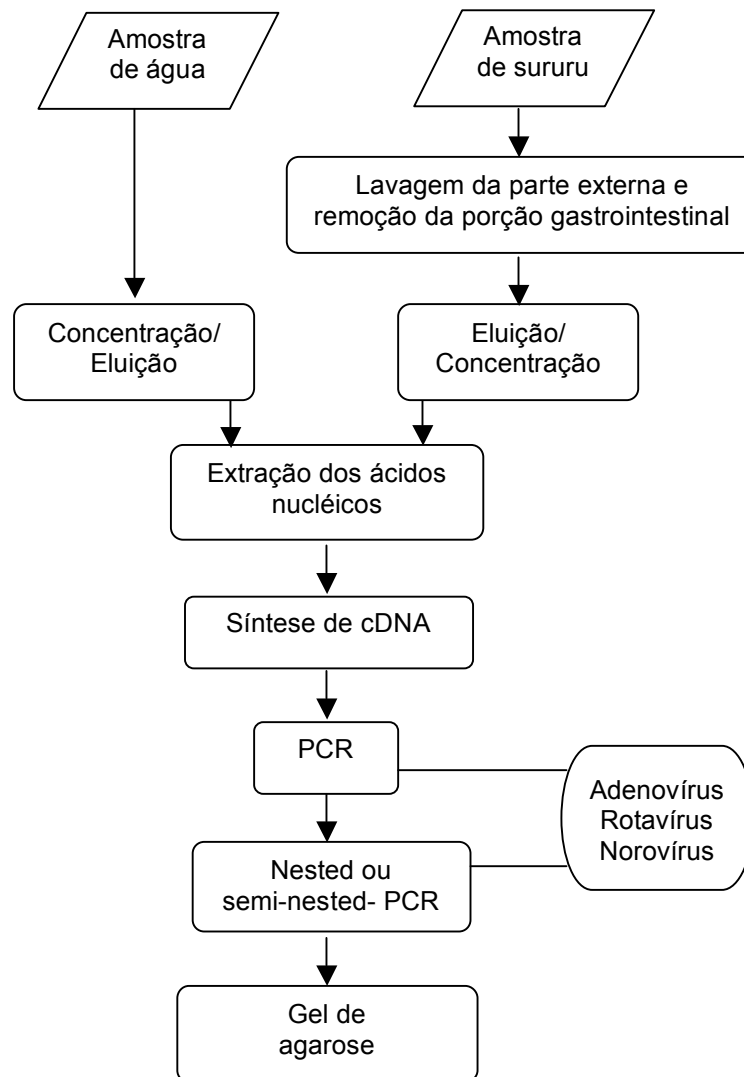


Figura 9: Visualização do resultado em cartelas. A: Visualização de poços amarelos correspondendo ao resultado positivo para Coliformes Totais; B: Visualização de poços fluorescentes sob luz UV, correspondendo ao resultado positivo para *E. coli* (B)

4.5.2 Vírus

A detecção de vírus entéricos na água e no mexilhão consistiu de 4 etapas: Concentração/eluição, extração de ácidos nucleicos, síntese de DNA complementar (cDNA) e amplificação do material genético por PCR, descritas sumariamente no fluxograma 1.



Fluxograma 1: Principais etapas realizadas na detecção dos vírus entéricos nas amostras de água e de sururu

4.5.2.1 Concentração das amostras de água

A concentração das amostras de água e posterior detecção de vírus foi realizada utilizando a técnica de adsorção-eluição em membrana carregada negativamente, conforme metodologia proposta por Katayama, Shimasaki e Ohgaki (2002), com modificações. Em 1L da amostra de água foi adicionado 1L do tampão Tris/Ca⁺² (0,01M), pH=7,2. Após homogeneização, a solução foi filtrada em membrana de éster de celulose de poro 1,2µm (Millipore), para remoção de partículas maiores, utilizando recipiente de pressão para dispensação (Millipore) (figura 10). O filtrado teve o pH ajustado para 3,5 e foi novamente filtrado em membrana em éster de

celulose carregada negativamente, com $0,45\mu\text{m}$ de poro (Millipore). A membrana foi eluída com 10mL de NaOH 10mM e o eluato resultante foi neutralizado com H_2SO_4 50mM e TE 100X.

Após transferência para tubos Amicon Ultra-15 (Millipore), as amostras de água foram submetidas à técnica de ultrafiltração, consistindo em centrifugação a $6700\times g$ a 4°C até que o volume da amostra alcançasse cerca de $400\mu\text{L}$. A amostra permaneceu em freezer a -80°C até a extração de ácidos nucleicos.



Figura 10: Recipiente de pressão para dispensação (Millipore), constituído por uma bomba à vácuo (a), recipiente onde o volume de água é adicionado (b) e local para inserção da membrana (c). Também é possível visualizar a amostra após filtração (d).

4.5.2.2 *Eluição das partículas virais do mexilhão*

A parte externa dos mexilhões foi lavada em água corrente. Posteriormente, as valvas foram abertas com auxílio de faca estéril, e a porção gastrointestinal do marisco, removida (figura 11). Para a eluição das partículas virais do mexilhão, foram utilizadas as metodologias propostas por Traore e outros (1998), com modificações. Dez gramas de tecido foram utilizados para a detecção viral. Foi adicionado 1:7 (p/v) de tampão glicina-NaCl (0,1M/0,3M, $\text{pH}=9,5$). A mistura foi homogeneizada com um mixer (Walita) e centrifugada a $6.700\times g$ por 30 minutos a 4°C . O pH do sobrenadante foi ajustado para 7,5 e o mesmo volume de PEG-NaCl (16%, 0,6M) foi adicionado. A mistura permaneceu em agitador magnético por 12h e então foi centrifugada a $6.700\times g$ por 30 minutos a 4°C . O precipitado foi ressuspensão em 3mL de tampão Na_2HPO_4 (0,15M, $\text{pH} 9,0$) e centrifugado novamente a $6.700\times g$

por 30 minutos a 4°C. Uma alíquota de 400µL do sobrenadante foi coletada e armazenada a -80°C até a etapa de extração de ácidos nucleicos.



Figura 11: Visualização de etapas realizadas no processamento do sururu: lavagem (A), abertura (B), remoção da porção gastrointestinal (C) homogeneização com solução tampão (D).

4.5.2.3 *Extração dos ácidos nucleicos*

Para extração de ácidos nucleicos, foi utilizado o método de Boom e outros (1990). O método se baseia na adsorção dos ácidos nucleicos em micropartículas de sílica com auxílio do tiocianato de guanidina/EDTA como agente de lise celular e dissociação da ribonucleoproteína viral.

O RNA extraído foi submetido à reação de transcrição reversa para a obtenção do DNA complementar. Este procedimento foi adotado pois dois dos três vírus pesquisados são vírus RNA.

4.5.2.4 *Síntese de DNA complementar (cDNA)*

O DNA complementar foi sintetizado a partir de ácido nucleico extraído de todas as amostras, utilizando o protocolo proposto por Iturriza-Gomara e outros (1999) com modificações, conforme descrição a seguir. Uma mistura contendo 5µL de ácido nucleico extraído e 1µL de DMSO, foi desnaturado à 97°C por sete minutos e mantido em gelo por 2 minutos. Em seguida, foi adicionado a mistura de reação contendo tampão de reação 1X, 200µM de cada DNTP, 2,5mM de MgCl₂, iniciador

randômico hexanucleotídico pdN6™ (Amersham Biosciences) e 60U de enzima transcriptase reversa superscript II (Invitrogen). A mistura foi incubada à 42°C por uma hora e posteriormente a 95°C por 10 minutos. O cDNA foi armazenado em freezer a -20°C para posterior amplificação específica dos vírus pesquisados.

4.5.2.5 *Etapa de amplificação por PCR, nested e seminested-PCR*

Antes da etapa de amplificação, as amostras foram quantificadas utilizando espectrofotômetro Nanodrop® ND-100. Cerca de 1µg de DNA foi utilizado na primeira PCR.

4.5.2.5.1 Adenovírus

Para a amplificação de fragmento específico para adenovírus (AdV), um volume de 3,0 µL de produto de extração foi utilizado com a mistura de reação, conforme tabela 8, cobertos por 30µL de óleo mineral. A reação ocorreu a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C por 20s, 60°C por 20s e 72°C por 30s, e extensão final de 72°C por 7 minutos. Um microlitro do produto da PCR foi utilizado em reação de nested-PCR. A reação a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 1 minuto, seguido por extensão final de 72°C por 5 min. Ambas as reações ocorreram na termocicladora PTC-100, versão 7.0, MJ Research. Os iniciadores utilizados (tabela 9) nas reações de PCR (Hex1 e Hex2) e nested-PCR (NeHex3 e NeHex4), encontrados em região conservada do gene hexon, foram previamente descritos por Allard e outros (2001).

4.5.2.5.2 Rotavírus

Para a amplificação de fragmento específico para rotavírus (RV), um volume de 3,0µL de cDNA foi utilizado com mistura de reação conforme tabela 8, cobertos por 30µL de óleo mineral. A reação ocorreu a 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos a 94°C por 20s, 60°C por 20s e 72°C por 30s, e extensão final de 72°C por 7 min. Um microlitro do produto da PCR foi utilizado em reação de nested-PCR. A reação ocorreu a 94°C por 5min, 35 ciclos a 94°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 1 min, seguido por extensão final de 72°C por 5 min. Ambas as reações ocorreram na termocicladora PTC-100, versão 7.0, MJ Research. Os iniciadores utilizados (tabela

9) nas reações de PCR (RV1 e RV2) e nested-PCR (RV3 e RV4), encontrados em região conservada do gene VP7 para rotavírus do grupo A, foram previamente descritos por Hafliker e outros (1997).

4.5.2.5.3 Norovírus

Para a amplificação de fragmento específico para norovírus (NoV), um volume de 3,0µL de cDNA foi utilizado com a mistura de reação, conforme tabela 8. A reação ocorreu a 94°C por 5 min, seguida de 40 ciclos a 94°C por 30s, 50°C por 1 min e 72°C por 30s, e extensão final de 72°C por 7 min. Ambas as reações ocorreram na termocicladora Applied Biosystems Veriti. Os iniciadores utilizados (tabela 9) nas reações de PCR (SRII-1 e SRII-2) e seminested-PCR (SRII-2 e SRII-3), encontrados em região conservada do gene da RNA polimerase para o Genogrupo II (GII), foram previamente descritos por Hafliker e outros (1997). Devido à prevalência mundial de GII frente ao GI apenas GII foi pesquisado (LEES, 2000). Além disso, não havia um controle positivo para o Genogrupo I (GI), e não houve tempo hábil para os procedimentos necessários para detecção de G1.

Tabela 8: Concentrações finais dos reagentes da PCR em cada reação

	Tampão 10X	DNTP	MgCl₂	Iniciador sense ou antisense	TAQ
PCR AdV	1X	200µM	1,5mM	0,4µM	1U
n-PCR AdV	1X	200µM	1,5mM	0,4µM	1U
PCR RV	1X	200µM	1,5mM	0,24µM	2U
n-PCR RV	1X	200µM	3,5mM	0,24µM	2U
PCR NoV	1X	200µM	2,5mM	0,4µM	1,25U
n-PCR NoV	1X	200µM	2,0mM	0,4µM	1,25U

Tabela 9: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores

Virus	Iniciador	Sequência (5'→3')	Amplicon (pb)
AdV	Hex1	GCCSCARTGGKWCWTACATGCACATC	301
	Hex2	CAGCACSCCICGRATGTCAA	
	NeHex3	GCCCGYGCMACIGAIACSTACTTC	171
	NeHex4	CCYACRGCCAGIGTRWAICGMRCYTTGTA	
RV	RV1	GTCACATCATACAATTCTAATCTAAG	1059
	RV2	CTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTG	
	RV3	TGTATGGTATTGAATATACCAC	346
	RV4	ACTGATCCTGTTGGCCAWCC	
NoV	SRII-1	CGCCATCTTCATTCAAAA	514
	SRII-2	TWCTCYTTYTATGGTGATGATGA	203
	SRII-3	TTWCCAAACCAACCWGCTG	

4.5.2.6 Visualização dos produtos de nested ou seminested-PCR em gel de agarose

Os produtos de nested ou seminested-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,8%, contendo 0,5µg/ml de brometo de etídeo, em tampão TBE 1X, por 1h a 100V. Foi aplicado em gel de agarose, padrão de peso molecular de 100pb. O gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado por câmera digital, para registro do resultado. O tamanho dos fragmentos (amplicons) esperados após a PCR ou nested ou semi-nested PCR podem ser visualizados na tabela 9.

4.5.2.7 Controle de qualidade

Em todas as etapas foram utilizados controles positivos e negativos. Para realização do controle positivo, na etapa de concentração inicial, foram inoculadas nas amostras de água e de sururu, cerca de 400µL de suspensão de fezes positivas a 10%, em tampão Tris/HCl-CaCl₂ (0,01M, 0,0015M) pH=7.2, para cada um dos vírus pesquisados, a fim de garantir que a metodologia utilizada fosse capaz de identificar resultados positivos. As amostras com fezes positivas obtidas de crianças com diarreia, foram cedidas pela prof. Dra. Lílana Cruz Spano do Núcleo de Doenças Infeciosas/UFES ou pelo prof. Dr. José Paulo Leite do Departamento de Virologia da Fundação Oswaldo Cruz/RJ. Após inoculação, o procedimento seguiu as mesmas etapas realizadas para as amostras ambientais. Para realização do controle negativo, foi utilizado 1L de água destilada autoclavada ao invés da amostra, e procedeu-se da mesma forma que as amostras nas demais etapas.

Nas etapas de extração, cDNA, PCR e nested ou seminested-PCR, também foram utilizados controles positivo, utilizando amostras previamente confirmadas como positivas, e negativo, substituindo a amostra por água milli-Q. Todas as misturas de reação foram preparadas em capela de fluxo laminar. Quando resultados negativos eram obtidos, novas amplificações foram realizadas para aumentar a confiabilidade do resultado.

4.5.2.8 Análise Estatística

Utilizando o programa STATA 9.0, 20% das amostras foram selecionadas aleatoriamente para repetição dos procedimentos a partir de nova extração de ácidos nucleicos, a fim de obter a confirmação dos resultados.

Foi realizada estatística descritiva dos resultados obtidos utilizando o programa Excel 2003 (Office, XP). Para os resultados das análises físico-químicas foram avaliados: mediana, mínimo e máximo, e para os resultados das análises bacteriológicas: média geométrica, mediana, mínimo e máximo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos nos 14 meses de monitoramento dos três pontos de coleta de água (P1, P2 e P3) e do sururu do mangue, quanto às análises físico-químicas da água, bacteriológicas e virológicas.

5.1 Análises físico-químicas

Os resultados dos parâmetros físico-químicos (turbidez, condutividade e sólidos dissolvidos totais) ao longo do monitoramento podem ser visualizados nas figuras 12, 13 e 14. São apresentados também o volume de chuva acumulado nos cinco dias anteriores à data da coleta de cada mês, conforme adotado por He e He (2008). Os dados de precipitação pluviométrica foram obtidos pelo Instituto de Meteorologia (INMET), para a estação automática do município de Vitória/ES.

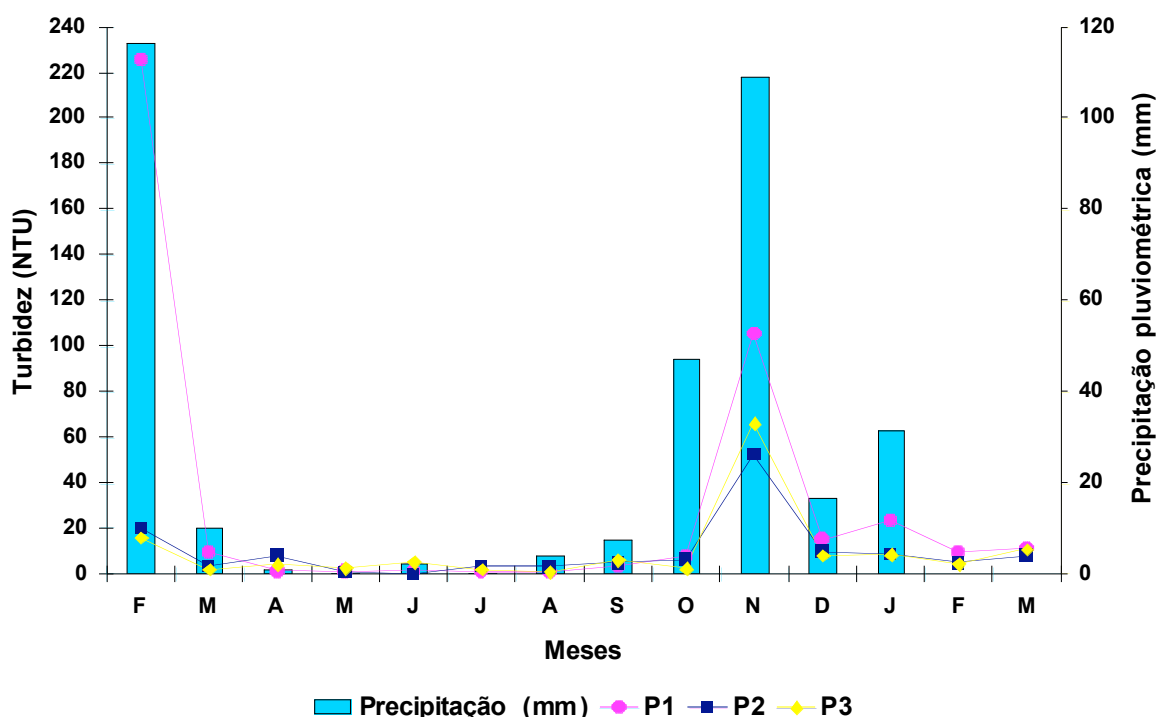


Figura 12: Monitoramento da turbidez e valores acumulados de chuva para os cinco dias anteriores ao dia de coleta, de fevereiro/2008 a março/2009

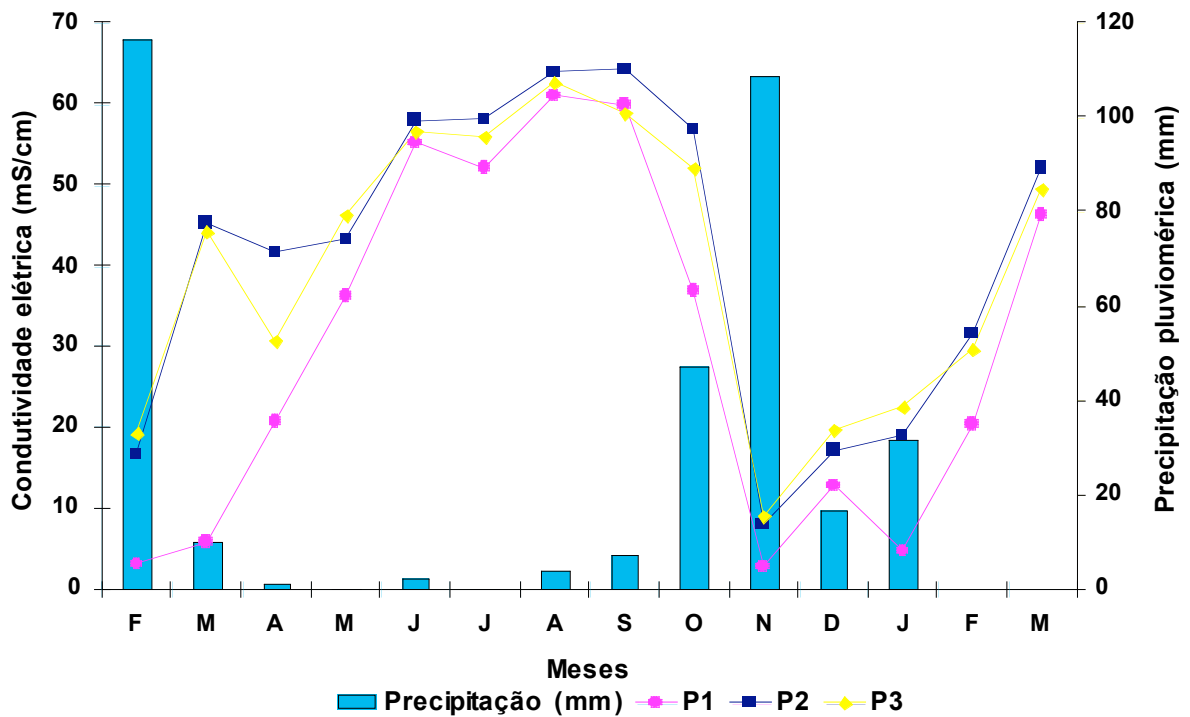


Figura 13: Monitoramento da condutividade e valores acumulados de chuva para os cinco dias anteriores ao dia de coleta, de fevereiro/2008 a março/2009

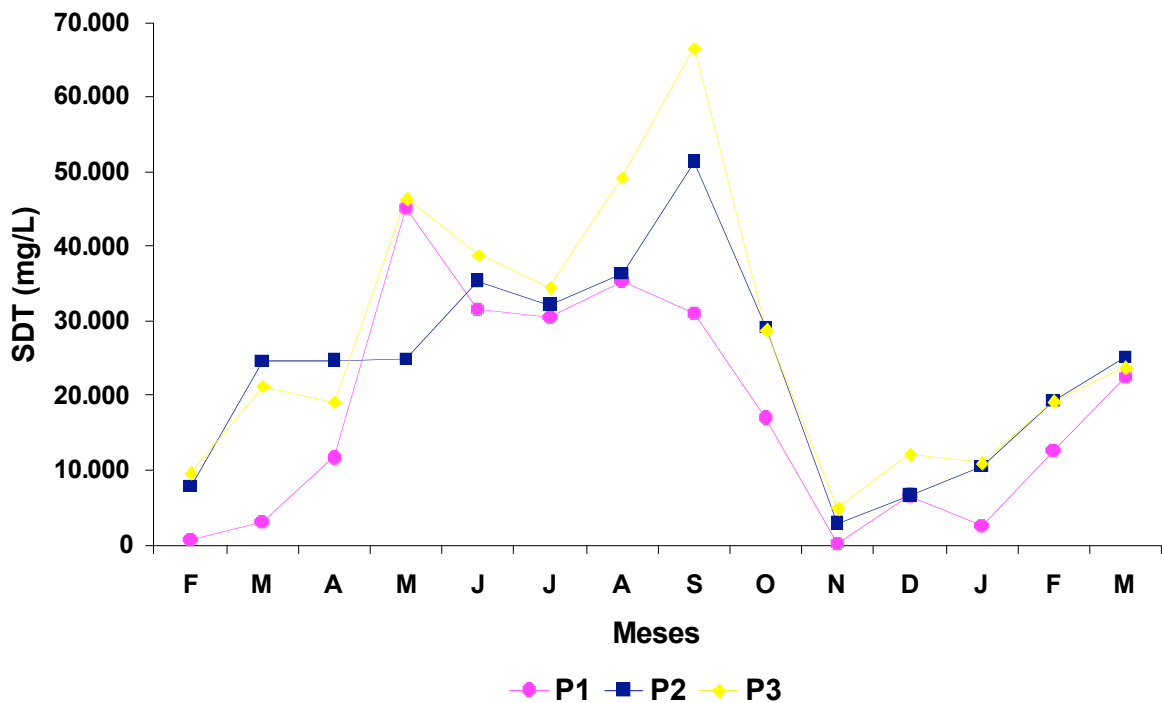


Figura 14: Resultados do parâmetro Sólidos Dissolvidos Totais (SDT) para o período de monitoramento de fevereiro/2008 a março/2009.

Observa-se que no ponto de coleta 1, registrou-se os maiores valores de turbidez e menores de condutividade e Sólidos Dissolvidos Totais (SDT), quando comparado aos outros pontos. Este ponto é o mais próximo ao rio, sofrendo, assim, maior influência da água doce. Na tabela 10 visualizam-se a mediana e os valores máximos e mínimos dos parâmetros físico-químicos analisados em cada ponto durante todo o monitoramento.

Tabela 10: Estatística descritiva dos parâmetros físico-químicos analisados durante os 14 meses de monitoramento (n=14).

Parâmetro	Ponto de coleta	Mediana	Mínimo	Máximo
pH	P1	7,51	6,90	8,28
	P2	7,56	7,12	8,07
	P3	7,55	7,02	7,55
Turbidez (UNT)	P1	8,67	0,68	225,76
	P2	5,61	0,00	52,36
	P3	4,93	1,02	65,96
Condutividade (mS/cm)	P1	28,5	2,7	60,9
	P2	44,2	8,0	64,2
	P3	45,0	9,0	63,0
SDT (mg/L)	P1	14.846	193	45.086
	P2	24.846	2.898	51.358
	P3	22.561	4.999	66.636

Os resultados das análises físico-químicas nos pontos de coleta 2 e 3 foram semelhantes entre si apesar do ponto 2 estar mais próximo ao mangue e o ponto 3, ao bairro de Ilha das Caieiras.

Os maiores valores de turbidez e os menores valores de condutividade e SDT ocorreram em fevereiro e novembro/2008, meses em que ocorreram as maiores precipitações do período de monitoramento. Assim, a principal discussão foi focalizada no parâmetro precipitação, por ter sido o principal parâmetro responsável pelas variações mais discrepantes dos dados.

Nos períodos mais chuvosos há um grande aporte de água doce e turva proveniente do rio. O valor máximo de turbidez em todos os pontos ocorreu nos períodos chuvosos, assim como o declínio da condutividade, indicando maior entrada de água doce no sistema nestes períodos. Sabe-se que há uma relação direta entre salinidade e condutividade (KRAMER, 1994). Neste período, observou-se, também, uma diminuição dos valores de SDT. Por se tratar de um sistema de água salobra, a

maior parcela dos sólidos dissolvidos está diretamente relacionada com os sais presentes na água, e assim, quanto maior a parcela de água doce no sistema, menor serão os valores de sólidos dissolvidos e de condutividade elétrica. Jeng e outros (2005) também obtiveram valores maiores de turbidez e pH no estuário analisado, após eventos chuvosos. Conforme resolução CONAMA 357/05, em água salobra classe 1, o pH deve permanecer entre 6,5 - 8,5, o que ocorreu nos pontos analisados. Na figura 15 pode-se visualizar o sistema estuarino da Baía de Vitória em período com e sem chuva anterior à data da coleta.

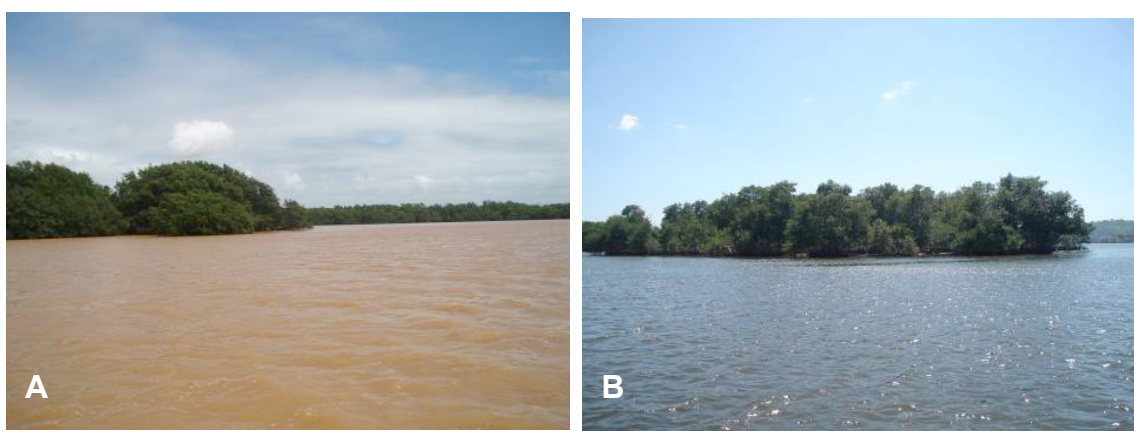


Figura 15: Vista parcial do sistema estuarino da Baía de Vitória, com ênfase no aspecto visual da água em dia de coleta precedida por precipitação pluviométrica elevada (fev/08 - A) e baixa (abr/08 - B)

Os parâmetros físico-químicos analisados neste trabalho já revelaram importância na variação de parâmetros microbiológicos. Microrganismos de origem fecal podem estar adsorvidos à matéria orgânica, partículas suspensas ou acumulando no sedimento, contribuindo para a persistência desses no ambiente. A turbidez se deve aos sólidos suspensos no ambiente e por isso pode estar relacionada com a presença de organismos patogênicos (LIPP et al., 2001). Os microrganismos também são influenciados pela salinidade do ambiente, a densidade microbiana diminui com o aumento da salinidade (COELHO; MARQUES; ROSEIRO, 1999). Assim, no caso do estuário estudado neste trabalho, sólidos dissolvidos e condutividade representaram esta variável.

5.2 Análises bacteriológicas

As variações de densidade de Coliformes Totais (CT) e *E. coli* ao longo dos 14 meses de monitoramento podem ser observadas nas figuras 16 e 17.

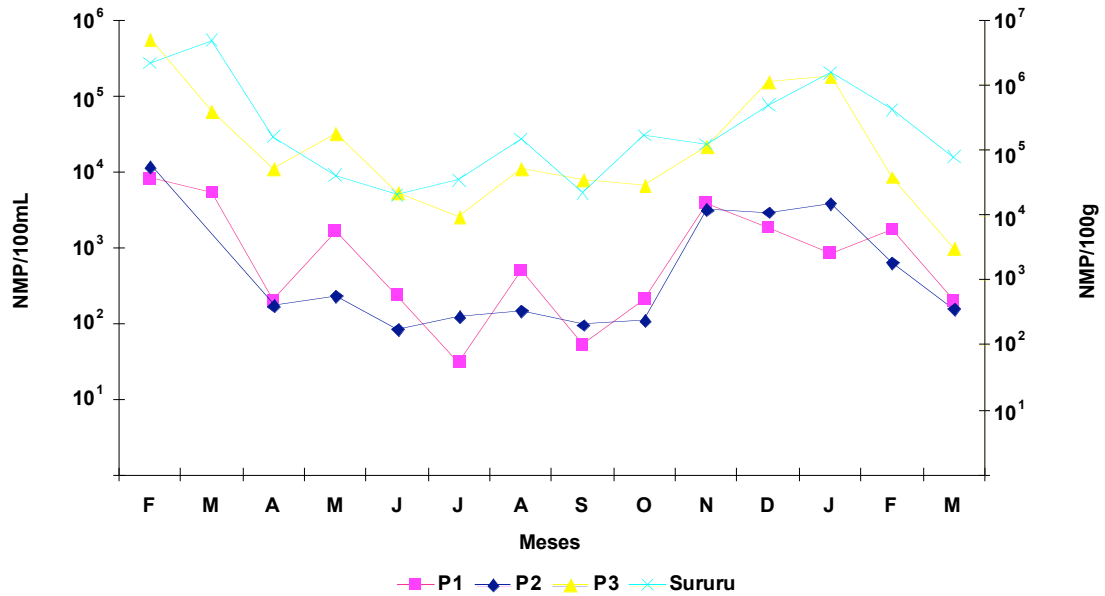


Figura 16: Monitoramento de Coliformes Totais (NMP) de fevereiro de 2008 a Março de 2009 nos três pontos de coleta de água e no sururu

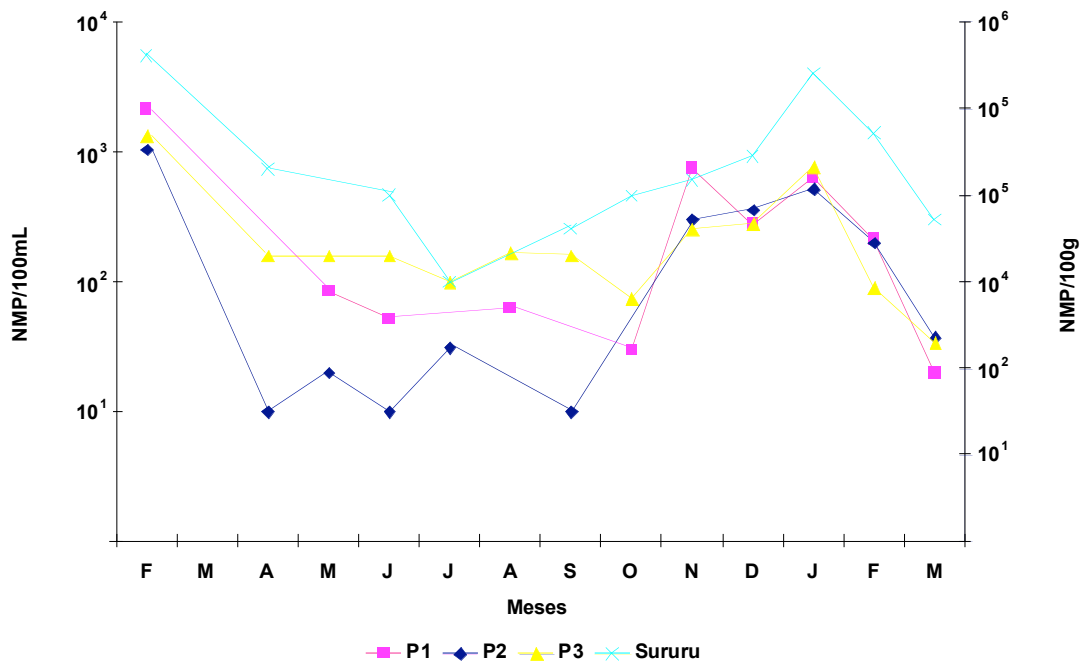


Figura 17: Monitoramento de *E. coli* (NMP) de fevereiro de 2008 a Março de 2009 nos três pontos de coleta de água e no sururu

A maior densidade de coliformes totais e *E. coli* foi encontrada no ponto 3, próximo ao cais do bairro Ilha das Caieiras, e nas amostras de sururu, coletado próximo ao ponto 2. Em geral, não foram observadas diferenças na densidade de coliformes totais (CT) e *E. coli* para os pontos 1 e 2. Na Tabela 11 pode-se comparar os resultados obtidos nos 3 pontos de monitoramento e no sururu.

Tabela 11: Resultados de estatística descritiva da concentração de Coliformes Totais (CT) e *E. coli* nas amostras pesquisadas

		Água (NMP/100mL)			Sururu do mangue (NMP/100g)
		P1	P2	P3	
CT	N	14	13	14	14
	Média geométrica	$6,15 \times 10^2$	$4,41 \times 10^2$	$1,82 \times 10^4$	$1,89 \times 10^5$
	Mediana	$6,77 \times 10^2$	$1,70 \times 10^2$	$1,11 \times 10^4$	$1,54 \times 10^5$
	Mínimo	$3,1 \times 10^1$	$8,40 \times 10^1$	$9,70 \times 10^2$	$2,00 \times 10^4$
	Máximo	$8,05 \times 10^3$	$1,14 \times 10^4$	$5,52 \times 10^5$	$4,87 \times 10^6$
<i>E. coli</i>	N	10	11	13	11
	Média geométrica	$1,58 \times 10^2$	$7,20 \times 10^1$	$2,37 \times 10^3$	$1,86 \times 10^4$
	Mediana	$1,49 \times 10^2$	$3,74 \times 10^1$	$2,00 \times 10^3$	$1,48 \times 10^4$
	Mínimo	<10	<10	$2,00 \times 10^2$	$1,00 \times 10^3$
	Máximo	$2,14 \times 10^3$	$1,05 \times 10^3$	$4,94 \times 10^4$	$4,10 \times 10^5$

A maior densidade de bactérias detectadas em P3 sugere que a contaminação proveniente do bairro Ilha das Caieiras e, provavelmente, também dos outros bairros adjacentes, é um dos principais contribuintes para a contaminação do estuário. Nesta região, pode-se perceber visualmente, o lançamento de efluentes provenientes das edificações. Além disso, devido à presença constante de barcos na região, foi possível visualizar manchas de óleo sobre a água e resíduos sólidos nas margens do manguezal e das casas. Conforme resolução CONAMA 357/05, em água salobra classe 1, óleos e graxas e materiais flutuantes devem ser virtualmente ausentes.

Os bairros mais próximos da região de estudo, na Baía noroeste de Vitória, se localizam na região mais carente de Vitória e de povoação mais recente. Vários bairros surgiram a partir da ocupação do lixão da cidade e da invasão de áreas de manguezal, no final da década de 70 (PREFEITURA DE VITÓRIA, 2009). Por esta razão não há ainda na região de estudo, um sistema de coleta de esgotos, e os lançamentos são efetuados no estuário.

Em trabalho realizado anteriormente na região, foi observada uma importante contribuição de esgoto não tratado lançado no Rio Santa Maria, no município de Serra (CORREIA JUNIOR, 2003). Essa fonte de contaminação estaria afetando o principalmente o ponto 1, mais próximo ao rio Santa Maria da Vitória. No ponto 2, sua maior proximidade com o manguezal pode ter contribuído para os resultados de densidade bacteriana encontrados. Com o aumento da turbulência da água, as bactérias acumuladas no sedimento podem entrar em ressuspensão. Segundo Haller e outros (2009) o sedimento pode agir como reservatório para diferentes poluentes, inclusive bactérias indicadoras de contaminação fecal. No trabalho desenvolvido por estes autores, foram detectadas densidades maiores no sedimento do que na coluna d'água do rio analisado.

A maior densidade de coliformes observada nos 3 pontos de coleta ocorreu no mês de fevereiro/2008, coincidindo com o maior valor de precipitação acumulada ocorrido ao longo do monitoramento (figura 12). Os valores mais elevados obtidos para coliformes totais e *E. coli* no período chuvoso podem estar relacionados a um maior influxo de água do rio no estuário e de água de escoamento proveniente dos bairros adjacentes. Em eventos chuvosos, o escoamento superficial (*runoff*) pode contribuir para o aumento da concentração de contaminantes. Jordão e Pessoa (1995) relatam que em áreas de carência de infra-estrutura, há muito esgoto sanitário ligado à drenagem pluvial e por isso a lavagem das ruas nessas áreas constitui uma contribuição equivalente ao de esgotos domésticos primários. Von Sperling (2005) também afirma que as águas pluviais urbanas podem ser fonte de organismos patogênicos.

Um aumento da contaminação bacteriana nas amostras em que os dias de coleta eram precedidos por chuva foi observado, também, por Rigotto e outros (2003). Assim, até mesmo áreas com boa qualidade de água podem ser impactadas por eventos de curta duração, tais como tempestades, que podem levar a rompimentos no sistema de esgotos (RIOU, 2007; MOLISANI, 2005).

Jeng e outros (2005) detectaram um aumento significativo na densidade de bactérias indicadoras de contaminação fecal, após eventos de chuva, na coluna d'água e no sedimento de um ambiente estuarino. Em seu trabalho, cerca de 3 dias foram necessários para que a densidade de bactérias indicadoras da coluna d'água retornassem ao nível anterior à precipitação, e para o sedimento, foram necessários

cerca de 7 dias. A sedimentação das partículas suspensas contribuiu para a diminuição dos níveis de bactérias na coluna d'água, uma vez que até 30,4% das bactérias podiam ser detectadas adsorvidas a partículas em suspensão na água. A maior fração de bactérias indicadoras pôde ser encontrada livre na água, mesmo que distante do ponto de descarga, sendo levadas pelas correntes ou pelo vento. Foram encontradas bactérias indicadoras a cerca de 2.4 km de distância a partir da fonte de contaminação. Este estudo indicou a contribuição da drenagem pluvial no aumento da concentração de bactérias indicadoras e a importância do sedimento estuarino como reservatório de microrganismos, podendo prolongar a sobrevivência destes no ambiente e recontaminar a coluna d'água através de ressuspensão.

Correia Junior (2003) pôde observar em seu trabalho, no mesmo estuário avaliado nesta pesquisa, que a precipitação e a vazão do rio foram os parâmetros que apresentaram as maiores correlações positivas com as densidades de coliformes totais e *E. coli*. Tanto a salinidade como a temperatura podem exercer um papel importante na queda do número de bactérias. Também neste estudo, a temperatura variou entre 22°C e 27,8°C ao longo de 1 ano, sendo que este parâmetro não é dependente da sazonalidade em estuários tropicais.

Jesus e outros (2006), em trabalho realizado na mesma região, detectaram até 10⁴ NMP/100mL de *E. coli* na água, o mesmo valor máximo obtido no presente trabalho. A contaminação detectada no local de estudo é preocupante, pois o estuário próximo ao bairro Ilha das Caieiras é local de intensa atividade pesqueira e também de atividades recreativas. É importante que seja verificada se essa contaminação é elevada, comparando com o limite estabelecido em legislação. No Brasil, a legislação que determina as características que as águas doces, salobras e salinas devem possuir com finalidade de balneabilidade é a resolução CONAMA 274/2000.

Na resolução CONAMA 274/2000, as águas são definidas como próprias (excelente, muito boa, satisfatória) quando em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, colhidas no mesmo local, houver, no máximo, 1.000 coliformes fecais (termotolerantes) ou 800 *Escherichia coli* ou 100 enterococos/100 mL (valores estabelecidos para água própria satisfatória). Quando for utilizado mais de um indicador microbiológico, as águas terão as suas condições avaliadas, de acordo com o critério mais restritivo. São consideradas impróprias quando no trecho avaliado, o valor obtido na última amostragem for

superior a 2500 coliformes fecais (termotolerantes) ou 2000 *Escherichia coli* ou 400 enterococos/100 mL, ou ainda, incidência elevada ou anormal na região, de enfermidades transmissíveis por via hídrica, indicada pelas autoridades sanitárias, presença de resíduos ou despejos, sólidos ou líquidos, inclusive esgotos sanitários, óleos, graxas e outras substâncias, capazes de oferecer riscos à saúde ou tornar desagradável a recreação.

Para comparação dos resultados obtidos no presente estudo com a resolução CONAMA 274/2000, foi considerado o percentil 80% (p80) das densidades de *E. coli* obtidas ao longo do monitoramento. O ponto 3 poderia ser considerado impróprio para recreação de contato primário, pois apresentou resultados de p80 acima de 2000 *E. coli* /100mL. Os pontos 2 e 3 mantiveram-se dentro do limite permitido para água própria satisfatória, com p80 inferiores a 800 NMP/100mL de *E. coli*. Considerando-se a densidade de *E. coli* em cada mês, em geral, o ponto 3 poderia ser considerado próprio para recreação de contato primário durante todo o monitoramento, especialmente nos meses chuvosos (figura 18). Deve ser ressaltado, entretanto, que as análises realizadas foram mensais, e não semanais como prevê a legislação.

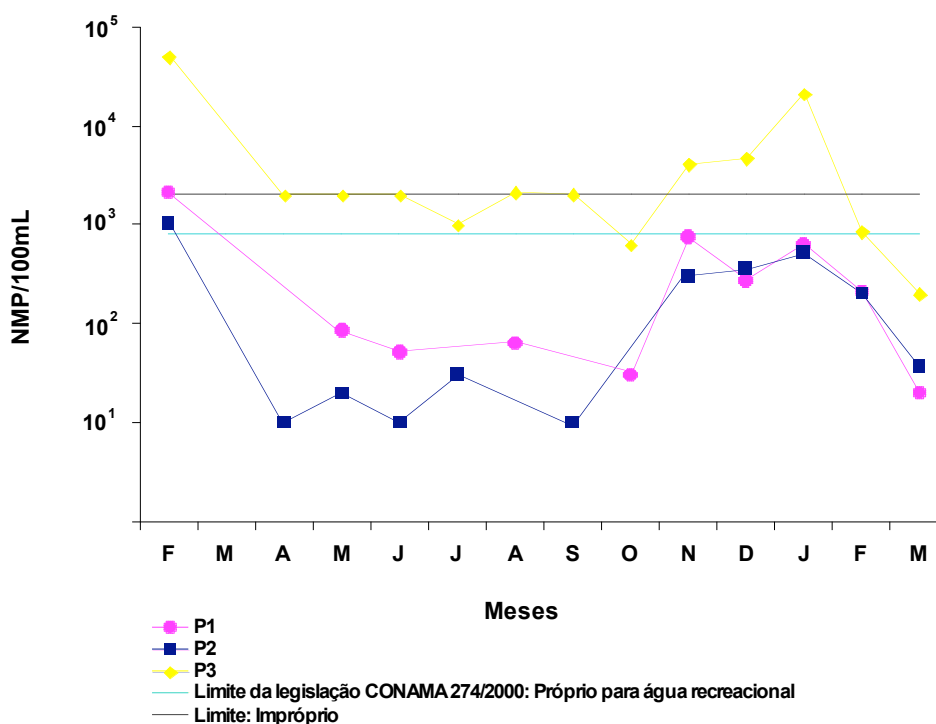


Figura 18: Limite estabelecido pela legislação brasileira para a qualidade de água recreacional (CONAMA 274/2000), considerando-se a tolerância de *E. coli*, para cada ponto de coleta de água

Além da resolução CONAMA 274/2000, que define das características necessárias para água de recreação, há ainda uma legislação que estabelece as características que a água deve possuir para outros usos (BRASIL, 2000). A resolução CONAMA 357/2005 classifica as águas conforme a qualidade associada aos seus usos preponderantes e apresenta as diretrizes ambientais para o seu enquadramento, considerando que o enquadramento destes corpos de água não deve, necessariamente, estar baseado no seu estado atual, mas nos níveis de qualidade que deveriam possuir para atender às necessidades da comunidade (BRASIL, 2005). Por isso, para o sistema estuarino da Baía de Vitória, e de acordo com seus usos preponderantes, infere-se que esse sistema poderia classificado como de classe 1 para água salobra. Por isso, os parâmetros que serão utilizados para comparação são aqueles definidos para esta classe.

A resolução CONAMA 357/05 impõe o limite de 1000 coliformes termotolerantes/100mL em 80% ou mais de pelo menos 6 amostras coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral, para usos que não sejam cultivo de moluscos bivalves ou recreação (BRASIL, 2005). Utilizando o p80 da densidade de *E. coli* como referência, este limite também foi ultrapassado para P3.

Na Europa, para águas de recreação de contato primário, conforme Diretiva 2006/7/CE, as concentrações de *E. coli* não devem exceder 500 UFC/100mL, baseadas em uma avaliação do percentil 95% (CEE, 2006).

Para o cultivo de moluscos bivalves destinados à alimentação humana, a média geométrica da densidade de coliformes termotolerantes, de um mínimo de 15 amostras coletadas no mesmo local, não deve exceder 43/100mL, e o percentil 90% (p90) não deverá ultrapassar 88/100mL. Esses índices devem ser mantidos em monitoramento anual com um mínimo de 5 amostras. A *E. coli* pode ser determinada em substituição ao parâmetro coliformes termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente. No monitoramento realizado no ponto 2, os resultados obtidos para *E. coli* em 11 amostras, tanto a média geométrica ($7,2 \times 10^1$ NMP/100mL) quanto o p90 dos resultados de *E. coli* ($5,2 \times 10^2$ NMP/100mL) ultrapassaram o limite recomendado. Quanto ao ponto 1, onde existe atualmente bancos de sururu, os limites também foram ultrapassados, com média geométrica de $1,58 \times 10^2$ e p90 de $8,89 \times 10^2$ NMP/100mL.

Quanto aos resultados nas amostras de sururu, foram observadas elevadas concentrações de bactérias ao longo do monitoramento, especialmente no período chuvoso. O sururu foi coletado nas raízes de árvores do manguezal, próximas ao ponto 2. Comparando-se a densidade bacteriana obtida para o sururu com a encontrada neste ponto, pode-se afirmar que o sururu foi capaz de concentrar partículas presentes na água, pois possuía em 100g de sua carne, mais de 400X a quantidade média de bactérias presentes em 100mL da água circundante (P2). Apesar de normalmente o sururu ser cozido antes do consumo, outros moluscos bivalves tais como ostras, são consumidas cruas, e podem representar elevado risco se consumidas, assim como os mexilhões quando são mal cozidos.

Densidades elevadas de bactérias no sururu coletado na região deste estudo já foram relatadas anteriormente. Jesus e outros (2006), em trabalho realizado na mesma região detectaram elevadas concentrações de coliformes totais (até 3×10^5 NMP/25g) e *E. coli* (até $5,5 \times 10^3$ NMP/25g) na carne do sururu analisado. No presente trabalho foi possível detectar até $4,86 \times 10^6$ NMP/100g de coliformes totais e até $4,1 \times 10^5$ NMP/100g de *E. coli* no sururu, confirmando os resultados anteriormente observados nessa região.

A fim de verificar se o sururu do local analisado é adequado para o consumo, procurou-se comparar os resultados obtidos com os limites estabelecidos nas legislações brasileira, americana e européia.

A Resolução RDC 12/2001 é a única legislação nacional que abrange moluscos bivalves, mas também diversos outros alimentos. Não há legislação específica para moluscos bivalves. Essa resolução determina que para moluscos bivalves cozidos, industrializados resfriados ou congelados, o limite estabelecido é de no máximo 5×10^5 coliformes a 45°C (coliformes termotolerantes). Para moluscos bivalves *in natura* o critério estabelecido é de 103 estafilococos coagulase positiva/g (BRASIL, 2001). Este parâmetro não foi analisado neste estudo, por isso, não pôde ser feita comparação com esta legislação.

Nos Estados Unidos (FDA, 2003), o critério utilizado para o controle de áreas de extração/cultivo/depuração de moluscos bivalves é baseado em coliformes totais ou termotolerantes e divididos em categorias. Para a categoria aprovado, em que os moluscos podem ser extraídos sem depuração, a água deve possuir uma média geométrica de coliformes totais e termotolerantes inferior a 70 e 14/100mL,

respectivamente. De acordo com a legislação americana, utilizando coliformes totais como referência, qualquer um dos pontos de água analisados neste estudo seria considerado proibido para cultivo/extração de mexilhões nos EUA.

Na Europa, a Diretiva 91/492/CE, determina que os moluscos bivalves vivos destinados ao consumo humano direto devem conter menos de 300 coliformes termotolerantes ou menos de 230 *E. coli*/100g de carne de molusco e líquido intervalvar, não conter salmonelas em 25g de carne de molusco, entre outras determinações. Acima de 60.000 coliformes termotolerantes/100g de carne, é proibida a extração, sem direito a submeter à depuração. Abaixo deste limite, o processo de depuração deve ser realizado (CEE, 1991). No sururu analisado neste estudo, o valor mínimo de *E. coli* encontrado foi de 1×10^3 NMP em 100g, ou seja, mais de 4 vezes o recomendado pela comunidade europeia. Considerando-se a média geométrica, foi detectado $1,86 \times 10^4$ NMP de *E. coli*/100g, o que conforme legislação europeia, a extração deveria ser submetida à depuração antes do consumo. No Brasil, ainda não há uma legislação federal que estabeleça um processo de depuração.

A falta de saneamento contribui com a maior parte da contaminação desse ambiente estuarino. A prefeitura do município de Vitória iniciou em 2008 um projeto para implantação do Sistema de Esgotamento Sanitário de Santo Antônio, São Pedro e bairros adjacentes, compreendendo redes coletoras e estação de tratamento de esgoto que beneficiará 22 bairros da região Noroeste de Vitória (Mario Cypreste, Santa Tereza, Santo Antônio, Caratoíra, Arivaldo Fassarela, Inhanguetá, Estrelinha, Bairro do Quadro, Bairro do Cabral, Bela Vista, São Pedro, Ilha das Caieiras, Condusa, Santos Reis, São José, Santo André, Redenção, Conquista, Resistência, Nova Palestina, Universitário e Grande Vitória) (PREFEITURA DE VITÓRIA, 2009). Assim, estudos que avaliem a qualidade do ambiente antes da implantação do sistema de esgotamento sanitário podem servir de base para que trabalhos futuros verifiquem a amortização dos impactos no estuário e em mexilhões após a implantação do sistema de tratamento.

5.3 Análises virológicas

5.3.1 Detecção de vírus entéricos na água

Os resultados obtidos ao longo do monitoramento dos vírus entéricos adenovírus (AdV) e rotavírus (RV) nos pontos de coleta de água, podem ser visualizados na tabela 12. Na tabela 13 encontram-se resumidos os resultados obtidos em cada um dos pontos de coleta de água e para todas as amostras de água analisadas.

Tabela 12: Monitoramento de Adenovírus (AdV) e Rotavírus (RV) em amostras de água, nos três pontos de coleta em área de manguezal

Data	P1		P2		P3	
	AdV	RV	AdV	RV	AdV	RV
2008						
Fev	ND	+	+	+	+	+
Mar	+	+	ND	ND	ND	+
Abr	ND	+	+	+	ND	ND
Mai	ND	+	+	ND	ND	+
Jun	+	+	+	+	+	+
Jul	+	+	+	+	+	+
Ago	+	+	+	+	+	+
Set	+	+	+	+	+	+
Out	+	+	+	+	+	+
Nov	+	+	+	+	+	+
Dez	+	+	+	+	+	+
2009						
Jan	+	ND	+	+	+	+
Fev	+	+	ND	ND	+	+
Mar	+	+	ND	+	ND	+

ND: Não Detectado

Tabela 13: Síntese dos resultados de detecção de AdV, RV e NoV GII nas amostras de água

Ponto de amostragem	Vírus	Nº amostras analisadas	Nº amostras positivas	% amostras positivas
P1	AdV	14	11	78,6%
	RV		13	92,9%
	NoV		0	0%
P2	AdV	14	11	78,6%
	RV		11	78,6%
	NoV		1	7,1%
P3	AdV	14	10	71,4%
	RV		13	92,9%
	NoV		1	7,1%
P1/P2/P3	AdV	42	32	76,2%
	RV		37	88,1%
	NoV		2	4,8%

Os resultados da amplificação do genoma viral pela técnica de PCR mostraram que o adenovírus foi detectado em 78,6% (11/14) das amostras dos pontos 1 e 2 em 71,4% (10/14) das amostras do ponto 3. Já o rotavírus foi detectado em 92,9% (13/14) das amostras dos pontos 1 e 3 e em 78,6% (11/14) das amostras do ponto 2. O norovírus GII foi detectado em apenas uma amostra nos pontos 2 e 3 (7,1%).

Nas figuras 19, 20 e 21 podem ser visualizados resultados da detecção de rotavírus (figura 19), adenovírus (figura 20) e norovírus GII (figura 21) após eletroforese em gel de agarose.

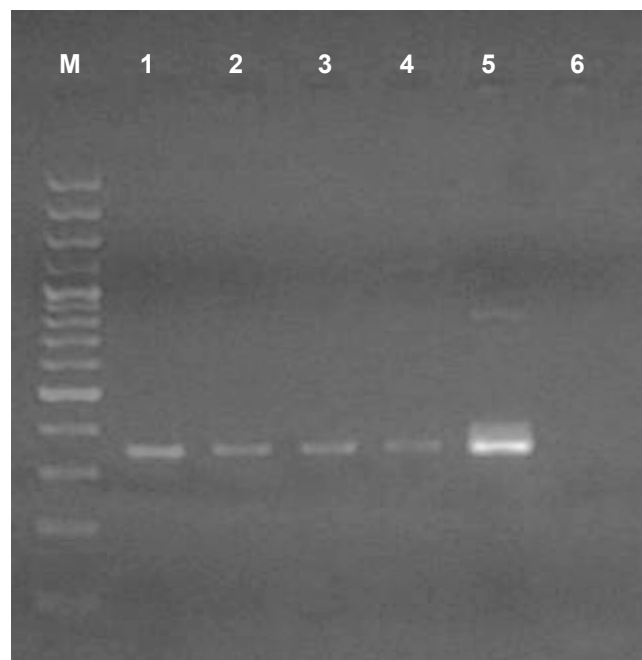


Figura 19: Detecção em gel de agarose de produto da nested-PCR para Rotavírus (banda de 346pb). M: Marcador de peso molecular de 100pb; Linhas 1-4: Bandas referentes às amostras de P1, P2, P3 e sururu, de março/2009, respectivamente. Linha 5: Controle positivo; Linha 6: Controle negativo.

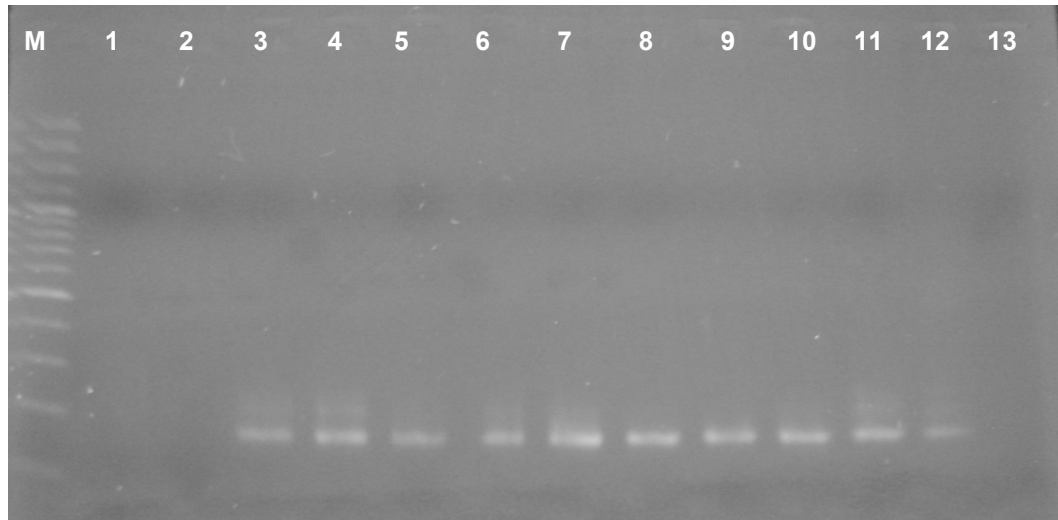


Figura 20: Detecção em gel de agarose de produto da nested-PCR para Adenovírus (banda de 173pb). M: Marcador de peso molecular de 100pb; Linhas 1-10: Bandas referentes às amostras P1 fev/08, P3 Mai/08, P1 jun/08, P2 jun/08, P1 ago/08, P3 ago/08, P1 set/08, P2 set/08, P3 set/08, P1 out/08, P2 out/08, respectivamente. Linha 12: Controle positivo; Linha 13: Controle negativo.

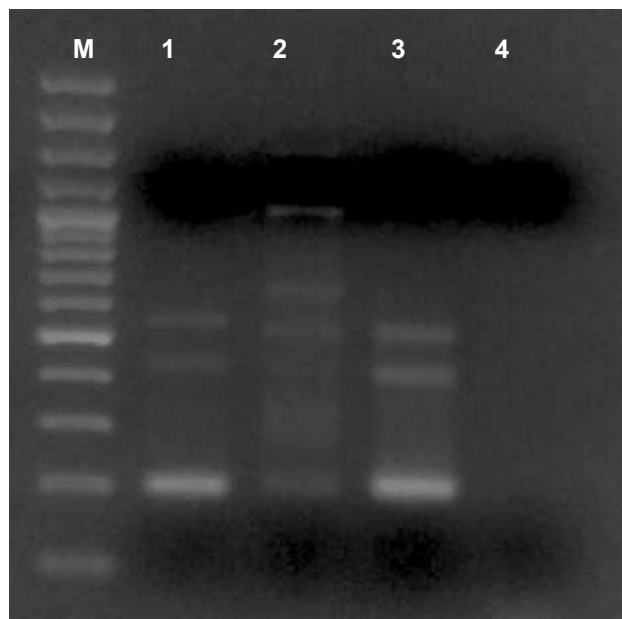


Figura 21: Detecção em gel de agarose de produto da nested-PCR para Norovírus (banda de 201pb). M: Marcador de peso molecular de 100pb; Linhas 1 e 2: Bandas referentes à amostra de P2 de maio/2008 (em duplicata); Linha 3: Controle positivo; Linha 4: Controle negativo.

Considerando o total de 42 amostras de água, referentes aos 3 pontos do sistema estuarino da Baía de Vitória, foram obtidas 32 amostras positivas para adenovírus (76,7%) e 37 amostras positivas para rotavírus (88,1%). Os adenovírus já foram sugeridos como indicadores de contaminação viral em amostras ambientais (PINA et al., 1998; FORMIGA-CRUZ et al., 2005) devido sua maior estabilidade em diversos ambientes, presença em praticamente todas as amostras de esgoto e maior resistência a alguns tratamentos de desinfecção (UV, cloro) do que outros vírus

(THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2003). Além disso, são excretados durante o ano todo e são os vírus mais prevalentes detectados por PCR no esgoto e em mariscos (PUIG et al., 1994). Enriquez e outros (1995) verificaram elevada resistência de adenovírus entéricos em água à qual eles atribuíram à maior persistência do ácido nucléico de vírus de DNA em ambientes aquáticos. Os rotavírus também podem ser detectados com elevada prevalência no ambiente por que assim como a maioria dos vírus entéricos, podem sobreviver por dias a semanas, dependendo das condições ambientais (GERBA et al., 1996). A prevalência de rotavírus também já foi observada por Miagostovich e outros (2008) em amostras de riachos em Manaus/Amazonas, onde foi possível detectar rotavírus em 44,2% das amostras, adenovírus em 30,8% e norovírus em 5,8%. Em 1997, Gilgen e outros analisaram amostras de água de rio e detectaram rotavírus em 100% das 6 amostras de água de rio analisadas.

A ocorrência de adenovírus e rotavírus neste estudo foi elevada quando comparada a trabalhos realizados em outros países. Na tabela 14 são apresentados os resultados de alguns estudos, com ênfase na prevalência de vírus entéricos.

Tabela 14: Detecção de vírus entéricos em amostras de água observada por diferentes autores

Referência/Local	Tipo de amostra	Resultados da detecção de vírus entéricos
Pina e outros (1998) Espanha	Água fluvial	Adenovírus em 65% das amostras.
Katayama e outros (2002) Japão	Água marinha	Norovírus em 25% das amostras.
Hot e outros (2003) França	Água fluvial	Norovírus em 1,5% das amostras. Rotavírus não foi detectado.
Choi; Jiang (2005) EUA	Água fluvial	Adenovírus em 16% das amostras.
van Heerden e outros (2005) África do Sul	Água fluvial	Adenovírus em 22% das amostras.
Kittigul e outros (2005) Tailândia	Água fluvial	Rotavírus em 20% das amostras.
Hamza e outros (2009) Alemanha	Água fluvial	Adenovírus em 97,5% das amostras, rotavírus em 90% e norovírus em 31,7%.
Presente estudo Brasil	Água estuarina	Adenovírus em 76,2% das amostras, rotavírus em 88,1% e norovírus GII em 4,8%.

Nas figuras 22 e 23 pode-se visualizar os resultados obtidos neste estudo através da frequência de pontos de coleta positiva para AdV e RV (figura 22) e a frequência de amostras de água positivas para AdV, RV e NoV GII (figura 23), no período de fevereiro de 2008 a Março de 2009. Não há representação específica para NoV, pois somente duas amostras foram positivas: o ponto 2 em maio/2008 e o ponto 3 em novembro/2008.

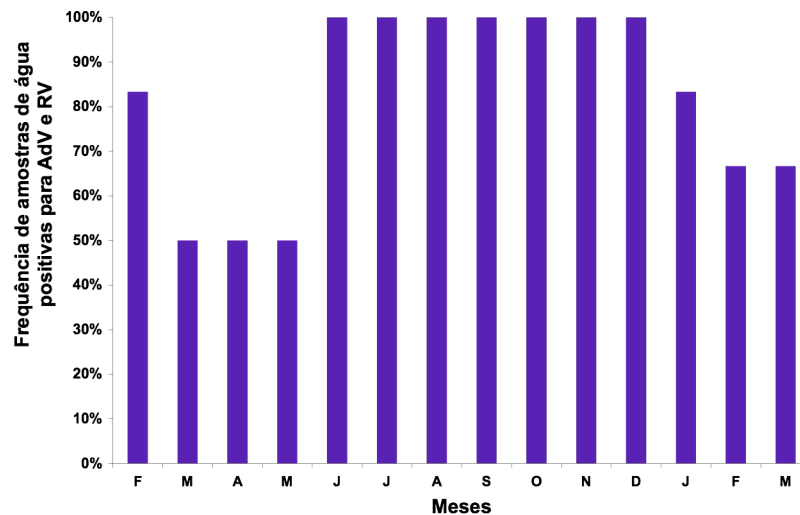


Figura 22: Frequência de amostras positivas para AdV e RV no período de fevereiro de 2008 a Março de 2009 de água nos pontos de coleta de água

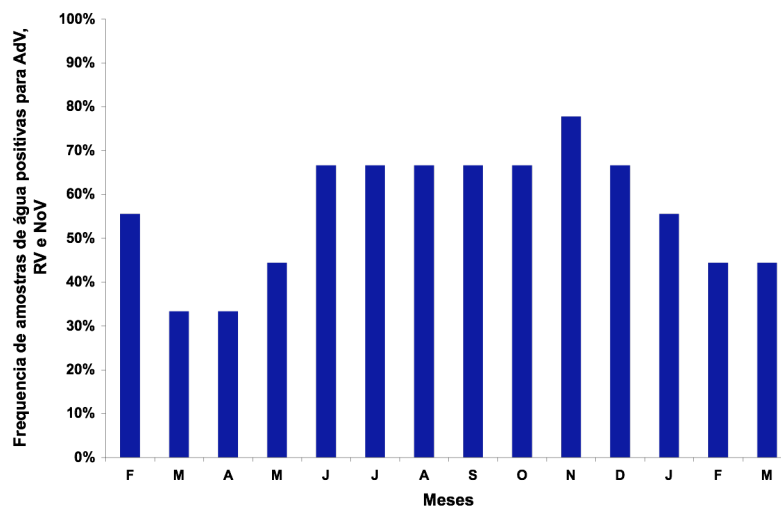


Figura 23: Frequência de amostras positivas para AdV, RV e NoV GII, no período de fevereiro de 2008 a Março de 2009 nos pontos de coleta de água

Em todos os meses de monitoramento, vírus entéricos foram detectados nas amostras de água. A maior prevalência de adenovírus e rotavírus ocorreu nos meses de Junho a Dezembro/2008 (inverno e primavera), com todos os 3 pontos

positivos para adenovírus e rotavírus, ocorrendo em meses com precipitação pluviométrica elevada ou baixa. É pertinente observar que no mês de novembro detectou-se o maior número de amostras de água positivas (figura 25) coincidindo com um período de elevada precipitação (figura 12). Além disso, nesse mesmo mês, também pôde ser detectada a presença de norovírus no ponto 3, sendo que este vírus não foi detectado durante o monitoramento, sendo apenas duas amostras positivas ao longo de todo o monitoramento. Um fator que pode estar relacionado à maior frequência de amostras positivas em novembro é que pode ter havido uma contribuição diferencial de esgoto sanitário neste mês, já que em meses mais chuvosos, o escoamento superficial é um importante contribuinte para a elevação nos níveis de contaminação por esgoto sanitário (JENG et al., 2005). Neste estudo, porém, observou-se que nos meses de menor precipitação também houve elevada incidência de vírus entéricos. Outros fatores que podem ter contribuído para a variação nos níveis de patógenos detectados durante o monitoramento: a intensidade solar, salinidade e temperatura, que são fatores implicados ao rápido decaimento ou persistência dos microrganismos (POMMEPUY et al., 2006). Assim, diferentes fatores podem influenciar na presença de patógenos, principalmente em um ambiente tão complexo como um estuário, que além dos fatores já citados pode-se somar a variação das marés. Por isso, mesmo que haja um influxo maior de esgoto em meses mais chuvosos, a maior intensidade solar, por exemplo, pode contribuir para a eliminação dos vírus mais rapidamente.

Embora não possa ser estabelecida uma relação entre a detecção de partículas virais por PCR e sua infecciosidade, a prevalência de material genético de vírus entéricos encontrada neste estudo é preocupante, pois sabe-se que a dose infecciosa dos vírus é baixa e portanto, podem causar doenças quando ingeridos (HERNROTH; ALLARD, 2007, GRAHAM; DUFOUR; ESTES, 1987).

A prevalência de vírus entéricos nos meses em que as densidades de indicadores bacterianos estavam abaixo do limite recomendado em legislação (figura 18), confirma que indicadores bacterianos não são bons indicadores de contaminação viral, como já foi relatado por outros pesquisadores (RIGOTTO, 2003; BURKHARDT III et al., 2000).

Apesar da falta de relação entre a presença de vírus entéricos e a de indicadores bacterianos, ainda não há legislação federal no Brasil que inclua a detecção de

indicadores virais. Na resolução CONAMA 274/2000, em águas classificadas como impróprias, há apenas a recomendação para a pesquisa de organismos patogênicos.

5.3.2 Detecção de vírus entéricos no mexilhão

Os mariscos bivalves são animais filtradores e podem concentrar microrganismos patogênicos em águas contaminadas com esgoto. O consumo de mariscos crus ou mal cozidos, tais como ostras e mexilhões, podem causar infecção gastrointestinal e hepatite (KITIGUL et al. 2007). Mariscos podem estar contaminados com diversos vírus entéricos que podem sobreviver no ambiente por semanas a meses, na coluna d'água ou adsorvidos nas partículas e acumulando nos sedimentos. De várias espécies de mariscos, apenas os moluscos bivalves podem ser considerados efetivamente como um veículo de transmissão de doenças virais. Evidências epidemiológicas sugerem que os vírus entéricos humanos são os agentes etiológicos mais comumente transmitidos por mariscos bivalves. Entre os bivalves, as ostras predominam como vetores de doença, mas mexilhões também são responsáveis por muitos surtos (LEES, 2000).

Os resultados de detecção de vírus no sururu mostraram que todas as 13 amostras coletadas (100%) foram positivas para a presença de adenovírus e rotavírus, e nenhum resultado positivo para norovírus foi observado. O número de amostras de sururu positivas para a presença do genoma de adenovírus e rotavírus foi maior do que nas amostras de água do ponto 2, de onde o sururu foi coletado, devido à concentração de partículas virais pelo mexilhão. Partículas de norovírus não foram detectadas nos tecidos analisados do sururu, o que pode ter ocorrido devido à baixa prevalência destes vírus em todas amostras de água (4,8% ou 2/42) ou devido a metodologia utilizada não ter sido tão eficiente para este vírus como foi para os outros dois vírus analisados.

A ocorrência de adenovírus e rotavírus foi elevada quando comparadas a trabalhos realizados em outras partes do mundo. Na tabela 15 são apresentados os resultados de alguns estudos, com ênfase na prevalência de vírus entéricos detectada.

Tabela 15: Detecção de vírus entéricos em amostras de moluscos bivalves observada por diferentes autores

Referência/Local	Resultados da detecção de vírus entéricos
Bosh e outros (1994) Espanha	Rotavírus em 56% das amostras de mexilhões que cresciam em áreas aprovadas para sua extração, conforme norma europeia.
Le Guyader e outros (2000) França	Rotavírus e norovírus em 52% e 37% das amostras de mexilhões, respectivamente. Os mesmos autores também detectaram vírus entéricos em ostras, porém a prevalência nestas foi menor do que nos mexilhões, o que pode ter ocorrido devido à recuperação mais eficiente de norovírus em mexilhões do que em ostras (HAFLIGER et al., 1997).
Nishida e outros (2003) Japão	Norovírus em 9% das amostras de ostras.
Rigotto (2003) Santa Catarina, Brasil	Adenovírus em 90% das amostras de ostras.
Karamoko e outros (2005) Marrocos	Adenovírus em 20% das amostras de mexilhões coletados em área contaminada por esgoto
Presente trabalho Espírito Santo, Brasil	Adenovírus e Rotavírus em 100% das amostras de mexilhão (sururu). Norovírus não foram detectados.

Assim como em amostras de água, a presença de vírus entéricos nos mariscos, detectadas por técnicas moleculares, não indica sua capacidade infecciosa. Acredita-se que outros fatores podem auxiliar a confirmar o risco de contaminação viral. Entre eles, o influxo constante de água contaminada com material fecal, evidenciado pela presença de *E. coli* ao longo de todo o monitoramento e a elevada capacidade de concentração dos mexilhões, que possibilita a constante reinfecção do sururu.

Apesar da elevada incidência de adenovírus e rotavírus encontrada nas amostras de sururu, o principal vírus relacionado a surtos associados a mariscos é o norovírus, que não foi detectado neste trabalho. O adenovírus e o rotavírus não são frequentemente associados a surtos de gastroenterites provocadas por mariscos, pois causam mais doenças em crianças, que não são grandes consumidoras de mariscos. No entanto, os norovírus podem infectar pessoas de todas as idades (LEES, 2000).

A elevada prevalência dos vírus no sururu confirma que estes animais filtradores são bons biomonitoradores da qualidade microbiológica do ambiente estudado. Nemonem e

outros (2008) sugeriram recentemente a utilização de mexilhões contaminados como bioindicadores de contaminação de agentes virais em águas costeiras.

A avaliação acurada da qualidade microbiológica de ecossistemas aquáticos auxilia na compreensão do impacto da destinação inadequada de esgoto sobre esses ecossistemas e conseqüentemente para a saúde da população, que utiliza a água e os alimentos provenientes deste. A permanência prolongada de vírus entéricos no ambiente, quando comparada às principais bactérias usualmente utilizadas como indicadores de contaminação fecal, pode ser um instrumento para indicar com maior confiabilidade se um local está livre de contaminação fecal (ENRIQUEZ et al., 1995). Para que ocorra a avaliação destes patógenos, é necessário que métodos de detecção mais sensíveis sejam desenvolvidos e avaliados, para que possam ser utilizados na detecção desses patógenos no ambiente.

6 CONCLUSÕES

As amostras de água e do sururu, provenientes de área de manguezal do sistema estuarino da Baía de Vitória, revelaram elevadas concentrações de Coliformes Totais e *E. coli* e elevada prevalência do genoma dos vírus entéricos adenovírus e rotavírus.

Os valores mais elevados de Coliformes Totais e *E. coli* foram observados no ponto três (água), no cais do bairro Ilha das Caieiras, e no sururu, em todos os meses avaliados.

A prevalência de adenovírus e rotavírus nas amostras de água e de sururu foi elevada. No sururu, todas as amostras foram positivas para ambos os vírus. A elevada contaminação das amostras indica que esta área está sob impacto antropogênico resultante do despejo de efluentes na região.

A pluviosidade foi um dos parâmetros relevantes na avaliação dos fatores correlacionados com a concentração de Coliformes Totais e *E. coli* na água. Em períodos chuvosos, ocorreram as maiores densidades bacterianas. A detecção dos vírus entéricos na água, por outro lado, foi maior em períodos mais secos, evidenciando diferenças na distribuição destes microrganismos.

Esta pesquisa torna-se um importante auxílio à decisões de implantação de medidas de proteção a este ambiente e na prevenção de surtos relacionados ao consumo de mexilhões contaminados.

7 RECOMENDAÇÕES

Verificar, em um novo monitoramento, a infecciosidade de vírus entéricos presentes na água e no mexilhão no sistema estuarino da Baía de Vitória por meio de cultura celular, a fim de verificar se existe um risco associado ao consumo de alimentos provenientes de áreas contaminadas por material fecal ou pela exposição ao ambiente contaminado.

Realizar a quantificação de vírus entéricos presentes na água e nos mexilhões, como auxílio na avaliação do risco associado a estas fontes, através de técnicas capazes de quantificar as partículas virais, como a PCR em tempo real.

Realizar a genotipagem de rotavírus e norovírus detectados em amostras de água a fim de determinar a prevalência dos genótipos dominantes e compará-los com os vírus isolados de pacientes com gastroenterite de origem viral. Outros métodos a serem utilizados são o sequenciamento e a avaliação filogenética dos genótipos obtidos.

Avaliar um processo de depuração em mexilhões com elevada contaminação bacteriana e viral, verificando quais características o processo de depuração necessita para garantir a inativação de vírus entéricos, além da viabilidade de sua aplicação.

Realizar um monitoramento após a implantação do sistema de esgotamento sanitário que atenderá a região de estudo, a fim de comparar com os resultados obtidos neste trabalho.

Avaliar a prevalência de vírus entéricos em amostras de sururu após o seu cozimento, bem como sua quantificação e verificação de sua infecciosidade.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASZADEGAN, M.; HUBER, M.S.; GERBA, C.P.; PEPPER, I.L.. Detection of enteroviruses in groundwater with the Polymerase Chain Reaction. **Applied and environmental Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1318-1324, 1993.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**, 3 ed. Artmed. 1997.

ALLARD, A.; GIRONES, R.; JUTO, P.; WADELL, G. Polymerase Chain Reaction for detection of adenoviruses in stool samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 12, p. 2659-2667, 1990.

ALLARD,A.; ALBINSSON, B.; WADELL, G. Rapid Typing of Human Adenoviruses by a General PCR Combined with Restriction Endonuclease Analysis, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 498-505, 2001.

American Public Health Association (APHA); American Water Works Association (AWWA); Water Environmet Federation (WEF). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, **American Public Health Assocation**, ed. 19, 1995.

APHA. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Ed. 3. Washington, D.C, 2001.

APHA; AWWA; WEF. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, **American Public Health Assocation**, ed. 21, 2005.

ATMAR, R. L.; ESTES, M. K. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 35, p. 275-290, 2006.

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

BARROSO, G. F.; PINHEIRO, E. B.; KLUG, H.; DALTOÉ, R. A.; PERIM, K.; LIMA, M. R. P. Contaminação bacteriana em areas costeiras e o cultivo de moluscos bivalves. 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2001.

BEURET, C.; BAUMGARTNER, A. SCHLUEP, J. Virus-contaminated oysters: a three-month monitoring of oysters imported to Switzerland. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 2292-2297, 2003

BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN P. M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BØRRETZEN, P. and SALBU, B. Bioavailability of sediment-associated and low-molecular-mass species of radionuclides/trace metals to the mussel *Mytilus edulis*. **Journal of Environmental Radioactivity**. Available online, 14/02/2009.

BOSH, A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview.

International Microbiology, v. 1, p. 191-196, 1998.

BOSH, A.; ABAD, F. X.; GAJARDO, R.; PNTÓ, R. M. Shoud shellfish be purified before public consumption? **Lancet**, v. 344, n. 8928, p. 1024-1025, 1994

BOXMAN, I.L.A.; TILBURG, J.J.H.C.; LOEKE N.A.J.M.; VENNEMA, H.; JONKER, K.; de BOER, E.; KOOPMANS, M. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108 p. 391–396, 2006.

BRASIL. Ministério da Defesa. Comissão Interministerial para os Recursos do Mar (CIRM). Resolução nº 05 de 13 de dezembro de 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada RDC 12 de 02 de Janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria MS 518 de 25 de Março de 2004.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução 04 de 18 de Setembro de 1985.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução 274 de 29 de Novembro de 2000.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução 375 de 17 de Março de 2005.

BRASIL. Presidência da República, Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos . Decreto 5564 de 19 de Outubro de 2005.

BUCKALEW, D.W.; HARTMAN, L. J.; GRIMSLEY, G. A.; MARTIN, A. E.; REGISTER, K. M. A long-term study comparing membrane filtration with colilert ® defined substrates in detecting fecal coliforms and *Escherichia coli* in natural waters. **Journal of Environmental Management**, v. 80, p. 191-197, 2006.

BURKHARDT III, W.; CALCI, K. R.; WATKINS, W.D.; RIPPEY, S. R.; CHIRTEL, S. J. Inactivaton of indicator microorganisms in estuarine waters. **Water Research**, v. 34, n. 8, p. 2207-2214, 2000.

CALGUA, B.; MENGEWEIN, A.; GRUNERT, A.; BOFILL-MAS, S.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A. WYN-JONES, A.P.; LÓPES-PILA, J.M.; GIRONES, R. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses form seawater samples. **Journal of Virological Methods**, v. 153, p. 79-83, 2008.

CARMO, T.M.S. Os manguezais ao norte da Baía de Vitória, Espírito Santo. **Anais do Simpósio sobre Ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira: Síntese dos conhecimentos**, v. 2, p. 173-194. Cananéia/SP, 1987.

CARMO, T.M.S.; PERRONE, E.C.; FUNDÃO, D.N.; MELO, R.M.S.; ZANOTTI-XAVIER, S. Macrofauna de invertebrados do estuário do rio Santa Maria da Vitória, Vitória, ES. **Anais do III Simpósio sobre Ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira: subsídios a um gerenciamento ambiental**, v. 1, p. 305-314, Serra Negra/SP, 1994.

CASTIGNOLLES, N.; PETIT, F.; MENDEL, I.; SIMON, L.; CATTOLICO L.; BUFFET-JANVRESSE, C. Detection of adenovirus in the waters of the Seine River estuary by nested-PCR. **Molecular and Cellular Probes**, p. 175-180, 1998.

CEE (Comunidade Económica Europeia). Directiva 91/492/CEE do Conselho, de 15 de Julho de 1991, que estabelece as normas sanitárias que regem a produção e a colocação no mercado de moluscos bivalves vivos. **Jornal Oficial da União Europeia** (versão em português), n. L268, p. 1-14, 24/09/1991.

CEE. Decisão do Conselho 1999/313/CE de 29 de abril de 1999. Relativa aos laboratórios de referência para controle das contaminações bacterianas e virais de moluscos bivalves. **Jornal Oficial da União Europeia**, n. L120, p. 40-41, 8/5/1999.

CEE. Diretiva 2006/7/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 15 de Fevereiro de 2006 relativa à gestão da qualidade das águas balneares e que revoga a Directiva 76/160/CEE. **Jornal Oficial das União Europeia** (versão em português), n. L64, p. 37-51, 04/03/2006.

CHOI, S.; JIANG, S.C. Real-Time PCR quantification of human adenoviruses in urban rivers genome prevalence but low infectivity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 7426-7433, 2005.

COELHO, M.P.P.; MARQUES, M.E.; ROSEIRO, J.C. Dynamics of microbiological contamination at a marine recreational site. **Marine Pollution Bulletin**, v.38, n. 12, p. 1242-1246, 1999.

CORREIA JUNIOR, Y. Estudo da Variação de parâmetros de qualidade de água em pontos da região do estuário do Rio Santa Maria da Vitória. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental. UFES, 2003.

CRABTREE, K. D.; GERBA, C. P.; ROSE, J. B.; HAAS, C. N. Waterborne adenovirus: a risk assessment. **Water Science and Technology**, v. 35, p. 1-6, 1997.

CROCI, L.; DE MEDICI, D.; SCALFARO, C.; FIORE, A.; DIVIZIA, M.; DONIA, D.; CONSENTINO, A.M.; MORETTI, P.; COSTANTINI, G. Determination of enteroviruses, hepatitis A virus, bacteriophages and *Escherichia coli* in Adriatic Sea mussels. **Journal of Applied Microbiology**. V.88, p. 293-298, 2000.

DE JONG, J. C.; WERMENBOL, A. G.; VERWEIJ-UIJTERWAAL, M. W.; SLATERUS, K. W.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.; VAN DOORNUM, G. J. KHOO, J. S. H.; HIERHOLZER, J. C. Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, p. 3940-3945, 1999.

DIOP, S. Vulnerability assessments of mangroves to environmental change. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 58, p.1-2. 2003.

ECKNER, F. Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the colilert and enterolert methods for detection of waterborne coliform bacteria, *Escherchia coli*, and *enterococci* used in drinking and bathing water quality monitoring in southern Sweden. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 8, p. 3079–3083, 1998.

EFSTRATIOU, M. A. Managing Coastal Bathing Water quality: The contribution of microbiology and epidemiology. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n. 6, p. 425-432, 2001.

ENRIQUEZ, C.E.; HURST, C.J.; GERBA, C.P. Survival of enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea and waste water. **Water Research**, v. 29, p. 2548-2553, 1995.

ESTES, M.K.; COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. **Microbiological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 410-449, 1989.

FDA (*Food and Drug Administration*). *U. S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Guide for the control of Molluscan Shellfish. National Shellfish Sanitation Program (NSSP)*, 2003.

FERREIRA, R. D. Os manguezais da Baía de Vitoria: um estudo de geografia física-integrada. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Departamento de geografia, 1989.

FIGUERAS, M.J.; POLO, F.; INZA, I.; GUARRO, J. Past, Present and Future Perspectives of the EU Bathing Water Directive. **Marine Pollution Bulletin**, v. 34, n. 3, p. 148-156, 1997.

FORMIGA-CRUZ, M.; HUNDESA, A.; CLEMENTE-CASARES, P.; ALBINANA-GIMENEZ, N.; ALLARD, A.; GIRONES, R. Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. **Journal of Virological Methods**, 2005.

FOUT G. S.; MARTINSON, B.C.; MOYER, M. W. N.; DAHLING, D. R.; A Multiplex Reverse Transcription-PCR Method for Detection of Human Enteric Viruses in Groundwater. **Applied And Environmental Microbiology**, v.69, p. 3158–3164,n. 6, 2003.

GALLIMORE, C. I.; CHEESBROUGH, LAMDEN, K.; BINGHAM, C.; GRAY, J. J. Multiple norovirus genotypes characterized from an oyster-associated outbreak of gastroenteritis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 323-330, 2005.

GEO BRASIL. Ambientes Marinhos e Costeiros. In: *Perspectivas do meio Ambiente no Brasil / Organizado por Thereza Christina Carvalho Santos e João Batista Drummond Câmara*. Ambi Brasília: Edições IBAMA, 2002.

GEOWEB VITORIA. Prefeitura de Vitória. Disponível em: <www.vitoria.es.gov.br>. Acesso em 24 de setembro de 2008.

GERBA, C.P.; ROSE, J.B.; HAAS, C.N.; CRABTREE, K.D. Waterborne rotavirus: a risk assessment. **Water Research**, v.30, p.2929-2940, 1996.

GILGEN, M.; GERMANN, D.; LUTHY, J.; HUBNER, Ph. Three-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A virus, and small round structured viruses in water samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 189-199, 1997.

GLASS, R. I.; PARASHAR, U. D.; BRESEE, J. S.; TURCIOS, R.; FISCHER, T.; WIDDOWSON, M.; JIANG, B.; GENTSH, J. R. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. **The Lancet**, v. 368, p. 323-332, 2006.

GOLLNER, R. A geografia geossitêmica e o estudo dos manguezais do estuário do Rio Santa Maria da Vitória (ES). **Anais do III Simpósio sobre Ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira: subsídios a um gerenciamento ambiental**, v. 1, p. 61-68, Serra Negra/SP, 1994.

GRAHAM, D. Y.; DUFOUR, G. R.; ESTES, M. K. Minimal infective dose of rotavirus. **Archives of Virology**, v. 92, n. 3-4, p. 261-271, 1987.

GREEN, D.H.; LEWIS, G.D. Comparative Detection Of Enteric Viruses In Wastewaters, Sediments And Oysters By Reverse Transcription-PCR And Cell Culture. **Water Research**, V.33, n. 5, p. 1195-1200, 1999.

GRIFFIN, D. W., DONALDSON, K. A., PAUL, J. H., ROSE, J. B. Pathogenic Human Viruses in Coastal Waters. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, p. 129-143, 2003.

HAFLIGER, D.; GILGEN, M.; LUTHY, J.; HUBNER, P. Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses seafood. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 27-36, 1997.

HALLER, L.; POTÉ, J.; LOIZEAU, J.; WILDI, W. Distribution and survival of fecal indicator bacteria in the sediments of the Bay of Vidy, lake Geneva, Switzerland. **Ecological Indicators**, v. 9, p. 540-547, 2009.

HAMZA, I. A.; JURZIK, L.; STANG, A.; SURE, K.; UBERLA, K.; WILHELM. Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. **Water Research**, doi: 10.1016/j.watres.2009.03.020, 2009.

HARAMOTO, E.; KATAYAMA, H.; OHGAKI, S. Detection of Noroviruses in Tap Water in Japan by Means of a New Method for Concentrating Enteric Viruses in Large Volumes of Freshwater. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 70, n.04, p. 2154-2160, 2004.

HE, L.; HE, Z. Water quality prediction of marine recreational beaches receiving watershed baseflow and stormwater runoff in southern California, USA. **Water Research**, v. 42, p. 2563-2573, 2008.

HERNROTH, B.; ALLARD, A. The persistence of infectious adenovirus (type 35) in mussels (*Mytilus edulis*) and oysters (*Ostrea edulis*). **International Journal of Food Microbiology**, v.113, p. 296-302, 2007.

HIERHOLZER, J. C.; Adenoviruses in the immunocompromised host. **Clinical Microbiology**. Rev. 5: 262-274, 1992.

HOBSON, N. S.; TOTHILL, I.; TURNER, A.P.F. Microbial detection. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 11, n. 5, p. 455-477, 1996.

HOT, D.; LEGEAY, J. J.; GANTZER, C.; CAUDRELIER, Y.; GUYARD, K.; LANGE, M.; ANDRÉOLETTI, L. Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. **Water Research**, v. 37, p. 4703-4710, 2003.

INMET – Instituto de Meteorologia. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br>>. Acesso em: 02Abr2009.

ISLAM, S.; TANAKA, M. Impacts of pollution on coastal on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, p. 624-649, 2004.

ITURRIZA-GOMARA, M.; GREEN, J.; BROWN, D.W.G.; DESSLBERGER, U.; GRAY, J. J. Comparison of specific and random priming in the reverse transcriptase polymerase chain reaction for genotyping group A rotaviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 78, p. 93-103, 1999.

JENG, H. A. C.; ENGLANDE, A. J.; BAKEER, R. M.; BRADFORD, H. B. Impacto f urban stormwater runoff on estuarine environmental quality. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 63, p. 513-526, 2005.

JESUS, H.C., AMORIM, N.R.; ALONSO, M.K. Investigação da poluição da Baía de Vitória-ES através da análise de metais, colimetria e agrotóxicos em sururu de mangue (*Mytella guyanensis*). XLVI Congresso Brasileiro de Química, 2006.

JONES, A. P.; SELLWOOD, J. Enteric viruses in the aquatic environment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 945-962, 2001.

JORDÃO, E. P.; PESSOA, C. A. Tratamento de esgotos domésticos. 3. ed - Rio de Janeiro: ABES, 1995.

KARAMOKO, Y.; IBENYASSINE, K.; AITMHAND, R.; IDAOMAR, M., ENNAJI, M.M. Adenovirus detection in shellfish and urban sewage in Morocco (Casablanca region)

by the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 126 p. 135-137, 2005.

KATAYAMA, H.; HARAMOTO, E.; OGUMA, K. YAMASHIDA, H. TAJIMA, A. NAKAJIMA, H; OHGAKI, S. One Year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. **Water Research**, v. 42, p. 1441-1448, 2008.

KATAYAMA, H.; SHIMASAKI,A.; OHGAKI, S. Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n.3, p. 1033–1039, 2002.

KITTIGUL, L.; EKCHALOEMKIET, S.; UTRARACHKIJ, F.; SIRIPANICHGON, K.; SUJIRARAT, D.; PUNGCHITTON, S.; BOONTHUM, A. An efficient virus concentration method and RT-nested PCR for detection of rotaviruses in environmental samples. **Journal of Virological Methods**, v. 124, p. 117-122, 2005.

KO, G.; JOTHIKUMAR, N.; HILL, V.R.; SOBSEY, M. D. Rapid detection of infectious adenoviruses by mRNA real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, n. 127, p. 148–153, 2005.

KOJIMA, S.; KAGEYAMA, T.; FUKUSHI, S.;HOSHINO, F.; SHINOHARA, M.;UCHIDA,K.; NATORI, K.;TAKEDA, N.; KATAYAMA, K. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. **Journal of Virological Methods**. V. 100, p. 107–114, 2002.

KOOPMANS, M.; DUIZER, E. Foodborne viruses: an emerging problem. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p.23-41, 2004.

KOOPMANS, M.; DUIZIER, E.; Foodborne viruses: an emerging problem. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 23-41, 2004.

KRAMER, K. J. M.; BROCKMANN, U. H.; WARWICK, R.M. Tidal Estuaries: Manual of sampling and analytical procedures. Commission of the European Communities, 1994.

KUMAZAKI, USUKU; NOGUSHI, 2007. New variant of Norovirus GII-4 strains prevalent in Yokohama City, October 2006-March 2007. **Japan Journal of Infectious Disease**. V. 60, 2007.

LE CLERC, H.; MOSSEL, D. A. A.; EDBERG, S.C.; STRUJK, C.B. Advances in the Bacteriology of the Coliform Group: Their Suitability as Markers of Microbial Water Safety. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 201-234, 2001.

LE GUYADER, F.; HAUGARREAU, L.; MIOSSEC, L.; DUBOIS, E.; POMMEPUY, M. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3421-3248, 2000.

LENOCH, R. Saúde pública e os moluscos marinhos cultivados. **Revista**

Gerenciamento Costeiro Integrado, n. 3, ano 2, p. 15-17, 2003/2004

LESS, D. Viruses and Bivalve Shellfish. **Internatitonal Journal of food Microbiology**, v. 59, p. 81-116, 2000.

LEWIS, G. D.; METCALF, T. G. P. Polyethylene Glycol Precipitation for Recovery of Pathogenic Viruses, Including Hepatitis A Virus and Human Rotavirus, from Oyster, Water, and Sediment Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1983-1988, 1988.

LIMA-JÚNIOR, C.B.; SOARES, S.C.; BONICENHA, W. Baía de Vitória: Aspectos históricos e culturais. Vitória: Editora Fundação Ceciliano Abel de Almeida/UFES, 1ªEd. 1994

LIPP, E. K.; KURZ, R.; VINCENT, R.; RODRIGUEZ-PALACIOS, C.; FARRAH, S. R.; ROSE, J. B. The effects of seasonal variability and weather on microbial fecal pollution and enteric pathogens in a subtropical esturay. **Estuaries**, v. 24, n. 2, p. 266-276, 2001.

LODDER, W.J.; VINJE´, J.;VAN DE HEIDE,R.;DE RODA HUSMAN,A.M. LEENEN E. J. T. M.; KOOPMANS, M. P. G. Molecular Detection of Norwalk-Like Caliciviruses in Sewage. **Applied and Environmetal Microbiolog**, v. 65, n. 12, p. 5624–5627, 1999.

LOGULLO, R. T. A influência das condições sanitárias sobre a qualidade das águas utilizadas para a maricultura no Ribeirão da Ilha – Florianópolis, SC. Dissertação de mestrado. Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental. UFSC, 2005.

LOODER, W.J.; RODA HUSMAN, A. M.; Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in the Netherlands. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1453-1461, 2005.

LOODER, W.J.; RODA HUSMAN, A.M. Presence of Noroviruses and Other Enteric Viruses In Sewage And Surface Waters In The Netherlands. **Applied And Environmental Microbiology**, v.71, n. 3, p. 1453–1461, 2005.

LOODER, W.J.; VINJÉ, J.; VAN DE HEIDE, R.; RODA HUSMAN, A. M.; LEENEN, E. J. T. M.; KOOPMANS, M. P. G. Molecular detecction of norwalk-like caliciviruses in sewage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5624-5627, 1999.

LOURENÇO, M.H.; THOMPSON, R.; DRUCKER, J., GRENIER, B. Rotavirus electrophoretotypes en infantile gastro-enteritis: An epidemiologic study. **Pathologie Biologie**, 1985.

LUGO, A. E.; SNEADAKER, S. C. The Ecology of mangroves. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 5, p. 39-64, 1974.

MATTION, N.; COHEN, J.; ESTES, M. The rotavirus proteins. In:_____ KAPIKIAN, A.Z. **Viral Infections of the Gastrointestinal Tract** . New York: Marcel Dekker, p. 169-249; 1994.

METCALF, T.G.; MELNICK, J.L.; ESTES, M.K. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology, a trip of over 50 years. **Annual Review of Microbiology**, 1995.

MIAGOSTOVICH, M. P.; FERREIRA, F. F. M.; GUIMARÃES, F. R.; FUMIAN, T. M.; DINIZ-MENDES, L.; LUZ, S. L. B.; SILVA, L. A.; LEITE, J. P. G. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 2, p. 375-382, 2008.

MOLISANI, M. M. Caracterização das Condições físico-químicas de estuários do Estado do Ceará. Programa: Zoneamento Ecológico e Econômico (ZEE) da Zona Costeira do Estado do Ceará. Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR, Superintendência Estadual do Meio Ambiente – SEMACE, Secretaria da Ouvidoria-Geral e do meio Ambiente _SOMA, Universidade Federal do Ceará, Governo do estado do Ceará, Fortaleza, 2005.

MULLENDORE, J. L.; SOBSEY, M. D.; SHIEEH, Y. S. C.; Improved method for the recovery of hepatitis A virus from oysters. **Journal of Virological Methods**, v. 94, p. 25-35, 2001.

MUNIAN-MUJIKI, I.; GIRONES, R.; LUCENA, F. Viral contamination of shellfish: evaluation of methods and analysis of bacteriophages and human viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 89, p. 109-118, 2000.

MUNIAN-MUJIKI, I.; GIRONES, R.; TOFIÑO-QUESADA, G.; CALVO, M. LUCENA, F. Depuration dynamics of viruses in shellfish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 125-133, 2002.

NENONEN, N.; HANNOUN, C.; HORAL, P. HERNROTH, B.; BERGSTROM, T. Tracing of norovirus outbreak strains in mussels collected near sewage effluents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 8, p. 2544-2549, 2008.

NISHIDA, T.; KIMURA, H.; SAITOH, M.; SHINOHARA, M.; KATO, M. FUKUDA, S.; MUNEMURA, T. MIKAMI, T.; KAWAMOTO, A.; AKIYAMA, M.; KATO, Y.; NISHI, K.; KOZAWA, K.; NISHIO, O. Detection, Quantitation, and Phylogenetic Analysis of Noroviruses in Japanese Oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 5782-5786, 2003.

NISHIDA, T.; NISHIO, O.; KATO, M.; CHUMA, T.; KATO, H.; IWATA, H. KIMURA, H. Genotyping and Quantitation of Noroviruses in Oysters From Two Distinct Sea Areas in Japan, **Microbiology and Immunology**, V. 51, N. 2, P. 177-184, 2007.

O'HALLORAN, F.; LYNCH, M.; CRYAN, B.; O'SHEA, H.; FANNING, S. Molecular Characterization of Rotavirus in Ireland: Detection of Novel Strains Circulating in the Population. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n.9, p. 3370–3374, 2000.

OMS – Organização Mundial da Saúde (WHO – *World Health Organization*). **Bulletin of the World Health Organization**, v.78, n. 2, 2000.

OMS – Organização Mundial da Saúde (WHO – *World Health Organization*). **Guidelines for drinking water quality**, 3 ed. Genebra, 2006.

OMS. Organização Mundial da Saúde (WHO – *World Health Organization*). **Guidelines for Drinking Water Quality - Health Criteria and Other Supporting Information**, v. 2, 1996.

OMS. Who promotes research to avert diarrhoea deaths, 2009. Disponível em: <http://www.who.int/pmnch/media/membernews/2009/childhood_diarrhoea/en/>, acesso em: 21mai2009.

ORTEGA, C.; SOLO-GABRIELE, H. M.; ABDELZAHER, A.; WRIGHT, M.; DENG, Y. Correlations between microbial indicators, pathogens, and environmental factors in a subtropical estuary. **Marine Pollution Bulletin**, doi: 10.1016/j.marpolbul.2009.04.015, 2009.

PINA, S.; MONTSERRAT, P.; LUCENA, F.; JOFRE, J. GIRONES, R. Viral Pollution in the environment and in Shellfish: Human Adenovirus detection by PCR as an Index of Human viruses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3376-3382, 1998.

POMMEPUY, M.; HERVIO-HEATH, D.; CAPRAIS, M.P.; GOURMELON, M.; LE SAUX, J. C.; LE GUYADER, F. Fecal contamination in coastal areas: An engineering approach. In: **Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment**, p. 331-359, 2006.

PREFEITURA DE VITÓRIA. Informações Municipais. Região VII. Disponível em: <www.vitoria.es.gov.br>. Acesso em: 12/03/2009.

PREFEITURA DE VITÓRIA. Lei municipal nº 3326 de 30 de Maio de 1986.

PREFEITURA DE VITÓRIA. Lei municipal nº 3377 de 11 de Novembro de 1986.

PREFEITURA DE VITÓRIA. **Vitória trabalha para ter 100% do esgoto tratado**. Data da publicação: 20/03/2009. Disponível em: <<http://sistemas6.vitoria.es.gov.br/diario/noticia.php?idNoticia=460>> Acesso em 10abr2009.

PRÜSS-USTÜN, A.; CORVALÁN, C. Preventing disease through healthy environments: Towards an estimate of the environmental burden of disease. 2006. **World Health Organization**. Disponível em: <http://www.who.int/entity/quantifying_ehimpacts/publications/preventingdisease.pdf>. Acesso em: 17 de Novembro de 2008.

PUIG, M.; JOFRE, J.; LUCENA, F.; ALLARD, A.; WADELL, G., GIRONES, R. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. **Applied and environmental Microbiology**, v. 60, n. 8, p. 2963-2970, 1994.

QUEIROZ, A.P.S.; SANTOS, F. M.; SASSAROLI, A.; HÁRSI, C. M.; MONEZI, T. A. MEHNERT, D. U. Electropositive Filter Membrane as an Alternative for the Elimination of PCR Inhibitors from Sewage and Water Samples. **Applied and environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4614-4618, 2001.

RIBEIRO, E. N. Avaliação de indicadores microbianos de balneabilidade em ambientes costeiros de Vitória/ES. Dissertação de mestrado. Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental. UFES, 2002.

RICHARDS, G. P.; WATSON, M. A.; FANKHAUSER, R. L.; MONROE, S. S. Genogroup I and II Noroviruses detected in stool samples by real-time reverse transcription-PCR using highly degenerate universal primers. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p. 7179-7184, 2004.

RIGO, D. Análise do escoamento em regiões estuarinas com manguezais – medições e modelagem na Baía de Vitória, ES. Tese: Doutorado. Departamento de Engenharia Oceânica/Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

RIGOTTO, C. ; SINCERO, T. C. M. ; SIMÕES, C. M. O. ; BARARDI, C. R. M. Detection of Adenovirus in shellfish by means of conventional-PCR, nested-PCR, and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). **Water Research**, Estados Unidos, v. 39, p. 297-304, 2005.

RIOU, P.; LESAUX, J.C.; DUMAS,F.; CAPRAIS, M.P.; LEGUYADER, S.F.; POMMEMPUY, M. Microbial impact of small tributaries on water and shellfish quality in shallow coastal areas. **Water Research**, v.41, p.2774-2786, 2007.

SALDANHA, J.C.S. Análise da Influência do Rio Santa Maria da Vitória na Baía de vitória, através da modelagem computacional: Uma contribuição ao processo de emquadramento. Dissertação: Mestrado. Programa de pós-graduação em Engenharia Ambiental, UFES. 2007.

SANTOS, N.S.O., Viroses Entéricas. In: SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. **Introdução à Virologia Humana**. Guanabara Koogan, p. 59-68, 2002.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Manguezais brasileiros: Região sudeste-sul. **Anais do Simpósio sobre Ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira: síntese dos conhecimentos**, p. 78-79, Cananéia/SP, 1987.

SOARES, C. C.;SANTOS,N.; BEARD, R. S.; ALBUQUERQUE, M.C.M.; MARANHÃO, A. G.; ROCHA, L. N.;RAMÍREZ,M.L.;MONROE,S.S.; GLASS,R.I.; GENTSCH, J. Norovirus Detection and Genotyping for Children with Gastroenteritis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, N. 8, 2007.

SOBSEY, M. D.; JONES, B. L. Concentration of Poliovirus from Tap Water Using positively Charged Microporous Filters. **Applied an Environmental Microbiology**, v. 37, n.3, p.588-595, 1979.

SOFFIATI, A. O manguezal na história e na cultura do Brasil, Ed. Faculdade de Direito de Campos, Campos dos Goytacazes/RJ, 2006.

SOUZA, E. M. Avaliação da contaminação por metais pesados (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn) no manguezal do rio Santa Maria da Vitória, Grande Vitória/ES, utilizando *Crassostrea rhizophorae* (Guildins, 1828) e *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) como biomonitores. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, 2002.

STEINMANN, J. Detection of Rotavirus in Sewage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 04 p. 1043-1045, 1981.

SUBEKTI D., LESMANA M., TJANIADI P., SAFARI N., FRAZIER E., SIMANJUNTAK C., KOMALARINI S., TASLIM J., CAMPBELL J.R., OYOFO B.A. Incidence of Norwalk-like viruses, rotavirus and adenovirus infection in patients with acute gastroenteritis in Jakarta, Indonesia. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.33, p. 27-33, 2002.

THURSTON-ENRIQUEZ, J. A.; HAAS, C. N.; JACANGELO, J.; GERBA, C. B. Chlorine Inactivation of Adenovirus Type 40 and Feline Calicivirus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 3979-3985, 2003.

TRAORE, O.; ARNAL, C.; MIGNOTTE, B.; MAUL, A.; LAVERAN, H.; BILLAUDEL, S.; SCHWARTZBROD, L. Reverse Transcriptase PCR Detection of Astrovirus, Hepatitis A Virus, and Poliovirus in Experimentally Contaminated Mussels: Comparison of Several Extraction and Concentration Methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.8 p. 3118-3122,1998.

UEKI, Y.; SANO, D.; WATANABE, T.; AKIYAMA, K.; OMURA, T. Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. **Water Research**, v. 39, p. 4271-4280, 2005.

UHNOO, L.; WADELL, G.; SVENSSON, L.; JOHANSSON, M. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. **Journal of Clinical Microbiology**, 1984.

UMESHA, K. R.; BHAVANI, N. C.; VENUGOPAL, M. N.; KARUNASAGAR, I. KROHNE, G.; KARUNASAGAR, I. Prevalence of human pathogenic enteric viruses in bivalve molluscan shellfish and cultured shrimp in south west coast of India. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, p. 279-286, 2008.

USEPA (*United States Environmental Protect Agency*). Office of Water Regulations and Standards. Ambient Water Quality for Bacteria. Washington, D.C,1986.

VAN HEERDEN, J.; EHLERS, M.M.; HEIM, A.; GRABOW, W.O.K. Prevalence, quantification and typing of adenoviruses detected in river and treated drinking water in South Africa. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p. 234-242, 2005.

VINJE, J., HAMIDJAJA, R.A., SOBSEY, M.D. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcriptase PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 116, p. 109-117, 2004.

VON SPERLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos, BH, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG, 2005.

WANG, D., WU, Q., KOU, X. YAO, L., ZHANG, J. Distribution of norovirus in oyster tissues. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1966–1972, 2008.

WILSON, J.G. Productivity, Fisheries and Aquaculture in temperate estuaries. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 55, p. 953-967, 2002.

ANEXO A – Tabua de marés no dia da coleta

DATA	HORA	ALTURA (m)
27/02/08	06:13	1.2
	12:32	0.5
26/03/08	05:04	1.3
	11:17	0.4
	17:54	1.3
23/04/08	04:06	1.4
	10:19	0.2
	16:58	1.4
28/05/08	03:30	0.6
	09:09	1.2
	15:38	0.4
25/06/08	07:24	1.2
	13:45	0.3
28/07/08	05:26	0.3
	12:23	1.2
25/08/08	03:53	0.4
	11:06	1.0
	17:32	0.6
27/09/08	07:54	0.0
	14:13	1.4
25/10/08	00:24	1.2
	06:45	0.2
	13:08	1.2
22/11/08	05:13	0.4
	11:45	1.1
	17:38	0.4
20/12/08	03:02	0.5
	09:11	1.0
	15:32	0.6
17/01/09	07:04	1.1
	13:13	0.5
14/02/09	05:47	1.2
	11:47	0.4
07/03/09	01:04	1.3
	06:58	0.5
	12:45	1.3

Fonte: <<http://www.mar.mil.br/dhn/chm/tabuas/index.htm>>
Consulta realizada para o Porto de Vitória.

ANEXO B – Planilha de Resultados dos Pontos de Coleta de Água e do Sururu

Data da coleta	Amostra	Turbidez (NTU)	pH	Condutividade (mS/cm)	Sólidos Dissolvidos (mg/L)	Coliformes Totais	<i>E. coli</i>	Adenovírus	Rotavírus	Norovírus
27/02/2008	P1	225,76	7,52	3,0	710	8,05E+03	2,14E+03	negativo	positivo	negativo
	P2	19,72	7,65	16,6	7.879	1,14E+04	1,05E+03	positivo	positivo	negativo
	P3	15,98	7,67	19,3	9.719	5,52E+05	4,94E+04	positivo	positivo	negativo
	SURURU	NR	NR	NR	NR	2,14E+06	4,10E+05	NR	NR	NR
26/03/2009	P1	9,52	7,55	5,8	3.065	5,20E+03	<1,0E+00	positivo	positivo	negativo
	P2	3,4	7,73	45,2	24.685	<1,00E+03	<1,0E+00	negativo	negativo	negativo
	P3	2,04	7,79	44,2	21.312	6,30E+04	<1,0E+00	negativo	positivo	negativo
	SURURU	NR	NR	NR	NR	4,87E+06	<1,0E+00	positivo	positivo	negativo
23/04/2009	P1	1,36	7,62	20,7	11.771	2,00E+02	<1,0	negativo	positivo	negativo
	P2	8,16	7,56	41,5	24.746	1,70E+02	1,00E+01	positivo	positivo	negativo
	P3	4,08	7,51	30,7	19.191	1,10E+04	2,00E+03	negativo	negativo	negativo
	SURURU	NR	NR	NR	NR	1,60E+05	2,00E+04	positivo	positivo	negativo
28/05/2008	P1	1,02	7,96	36,2	45.086	1,66E+03	8,50E+01	negativo	positivo	negativo
	P2	0,68	7,65	43,2	24.945	2,31E+02	2,00E+01	positivo	negativo	positivo
	P3	2,72	7,55	46,3	46.465	3,15E+04	2,00E+03	negativo	positivo	negativo
	SURURU	NR	NR	NR	NR	4,10E+04	<1,0E+04	positivo	positivo	negativo
25/06/2008	P1	1,36	7,64	55,2	31.542	2,33E+02	5,20E+01	positivo	positivo	negativo
	P2	0,00	7,56	57,8	35.414	8,40E+01	1,00E+01	positivo	positivo	negativo
	P3	5,44	7,52	56,6	34.573	5,20E+03	2,00E+03	positivo	positivo	negativo
	SURURU	NR	NR	NR	NR	2,00E+04	1,00E+04	positivo	positivo	negativo
28/07/2008	P1	1,02	7,53	52,0	30.552	3,10E+01	<1,0E+01	positivo	positivo	negativo
	P2	3,40	7,48	58,0	32.240	1,21E+02	3,10E+01	positivo	positivo	negativo
	P3	2,04	7,54	55,9	38.920	2,59E+03	1,00E+03	positivo	positivo	negativo
	SURURU	NR	NR	NR	NR	3,45E+04	1,00E+03	positivo	positivo	negativo
25/08/2008	P1	0,68	7,52	60,9	35.384	5,04E+02	6,30E+01	positivo	positivo	negativo
	P2	3,06	8,02	63,8	36.396	1,46E+02	<1,0E+01	positivo	positivo	negativo
	P3	1,02	7,69	62,6	49.302	1,11E+04	2,13E+03	positivo	positivo	negativo
	SURURU	NR	NR	NR	NR	1,48E+05	4,10E+03	positivo	positivo	negativo
27/09/2008	P1	3,4	7,74	59,8	31.014	5,20E+01	<1,0E+01	positivo	positivo	negativo
	P2	4,76	7,51	64,2	51.358	9,60E+01	10	positivo	positivo	negativo
	P3	6,12	7,49	58,9	66.636	7,71E+03	2,01E+03	positivo	positivo	negativo
	SURURU	NR	NR	NR	NR	2,18E+04	<1,0E+03	positivo	positivo	negativo
25/10/2008	P1	7,82	8,28	36,9	16.997	2,09E+02	30	positivo	positivo	negativo
	P2	6,46	8,07	56,8	29.139	1,09E+02	<1,0	positivo	positivo	negativo
	P3	2,38	7,85	52,1	28.839	6,57E+03	6,30E+02	positivo	positivo	negativo
	SURURU	NR	NR	NR	NR	1,66E+05	9,80E+03	positivo	positivo	negativo
23/11/2008	P1	105,4	7,06	2,7	193	3,24E+03	6,51E+02	positivo	positivo	negativo
	P2	52,36	7,12	8,0	2.898	3,89E+03	2,98E+02	positivo	positivo	negativo
	P3	65,96	7,02	9,1	4.999	2,33E+04	2,94E+03	positivo	positivo	positivo
	SURURU	NR	NR	NR	NR	1,50E+05	1,48E+04	positivo	positivo	negativo
20/12/2008	P1	14,96	7,03	12,7	6.644	1,79E+03	2,75E+02	positivo	positivo	negativo
	P2	9,86	7,30	17,1	12.169	2,91E+03	3,59E+02	positivo	positivo	negativo
	P3	8,16	7,37	19,8	44.066	1,55E+05	4,74E+03	positivo	positivo	negativo
	SURURU	NR	NR	NR	NR	4,88E+05	2,79E+04	positivo	positivo	negativo
17/01/2009	P1	23,46	6,9	4,7	2.476	9,40E+02	4,23E+02	positivo	negativo	negativo
	P2	8,50	7,40	18,9	10.526	5,14E+03	4,48E+02	positivo	positivo	negativo
	P3	8,50	7,50	22,4	11.071	2,10E+05	1,67E+04	positivo	positivo	negativo
	SURURU	NR	NR	NR	NR	1,52E+06	2,22E+05	positivo	positivo	negativo
14/02/2009	P1	9,52	7,25	20,3	12.694	1,47E+03	1,57E+02	positivo	positivo	negativo
	P2	4,76	7,55	31,5	19.336	1,36E+03	1,65E+02	negativo	negativo	negativo
	P3	4,42	7,66	29,6	19.243	6,35E+03	9,25E+02	positivo	positivo	negativo
	SURURU	NR	NR	NR	NR	4,19E+05	7,60E+04	positivo	positivo	negativo
14/03/2009	P1	11,22	7,49	46,2	22.444	1,38E+02	2,00E+01	positivo	positivo	negativo
	P2	8,16	7,51	52,0	25.189	1,28E+02	2,37E+01	negativo	positivo	negativo
	P3	10,88	7,57	49,4	23.809	9,70E+02	2,00E+02	negativo	positivo	negativo
	SURURU	NR	NR	NR	NR	5,99E+04	5,20E+03	positivo	positivo	negativo

* NMP/100mL – Amostras de água, NMP/100g – Amostras de Sururu
NR: Não Realizado