

COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE METACERCÁRIAS DE *Ascocotyle* sp (Trematoda: Digenea) DOS TECIDOS DE *Mugil liza* Valenciennes, 1836 (Teleostei: Mugilidae)

RENATO RIBEIRO NOGUEIRA FERRAZ¹, THALES KODI NAMBA², CAROLINA ALENCAR NIGRO³, FRANCISCO SANDRO MENEZES RODRIGUES⁴, JOÃO VICTOR FORNARI⁵, ANDERSON SENA BARNABÉ¹

¹Professor Doutor da Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brasil - renatoferraz@uninove.br

²Biólogo da Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brasil.

³Professora da Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brasil.

⁴Professor Doutor da Universidade Anhanguera de São Paulo – UNIAN, São Paulo, SP, Brasil.

⁵Professor Mestre da Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO

Nos últimos anos notou-se considerável aumento na procura e consumo de pescado, além de seus derivados. Contudo, os peixes são hospedeiros ideais de inúmeros parasitas, evidenciando a necessidade de desenvolvimento de novas metodologias de pesquisa para sua detecção. O objetivo do presente trabalho foi comparar a eficácia da extração de metacercárias de *Ascocotyle* (Trematoda: Digenea) em tecidos viscerais de *Mugil liza* Valenciennes, 1836 (Teleostei: Mugilidae), mediante duas metodologias: homogeneização por liquidificador ou por mixer. Foram coletadas 26 amostras, sendo 16 amostras de fígado e 10 amostras de tecido muscular de espécimes de *M. liza*. Cerca de 5g de cada amostra foram processadas pela técnica de homogeneização por liquidificador e pela técnica de homogeneização por mixer para a extração de metacercárias. Em amostras de fígado, até 46 metacercárias foram encontradas na homogeneização em

liquidificador. A menor quantidade encontrada foi de 2 metacercárias, para liquidificador e mixer. Em amostras de tecido muscular, observaram-se até 4 metacercárias na extração por mixer. A menor quantidade encontrada em amostras positivas foi de 1 parasita, para liquidificador e mixer. As médias de metacercárias encontradas e extraídas, por liquidificador e mixer, de tecido muscular foram de 0,2 ($\pm 0,357$) e 1,2 ($\pm 0,963$), respectivamente. Já as médias de metacercárias encontradas e extraídas, por liquidificador e mixer, do fígado dos peixes foram de 24 ($\pm 15,145$) e 18 ($\pm 8,246$), respectivamente. As técnicas de homogeneização, por liquidificador e mixer mostraram-se eficazes para extração de metacercárias dos tecidos de peixes mugilídeos, sugerindo que podem ser aplicáveis diretamente no campo de estudo, especialmente pela facilidade de realização do ensaio.

PALAVRAS-CHAVE: epidemiologia, gestão em saúde, homogeneização, metacercária, *Mugil liza*.

COMPARISON BETWEEN TWO METHODS OF METACERCARIAE OF *Ascocotyle* sp (Trematoda: Digenea) EXTRACTION FROM TISSUES OF *Mugil liza* Valenciennes, 1836 (Teleostei: Mugilidae)

ABSTRACT

The demand and consumption of fish and their derivatives has increased considerably in recent years. However, fish are ideal hosts of numerous parasites, highlighting the need to develop new research methodologies for its detection. The aim of present study was to compare the efficacy of *Ascocotyle* metacercariae (Trematoda:

Digenea) extraction from visceral tissues of *Mugil liza* Valenciennes, 1836 (Teleostei: Mugilidae) by two methods: homogenization by blender or mixer. Twenty-six samples of *M. liza* were collected, being 16 liver samples and 10 samples of muscle tissue. Approximately 5g of each sample were processed by blender and mixer

techniques homogenization for *metacercariae* extraction. In liver samples, up to 46 *metacercariae* were found in samples homogenized in blender. The lowest amount found was 2 *metacercariae* for blender and mixer techniques. In samples of muscle tissue, 4 *metacercariae* were observed in the mixer extraction. The lowest amount was found to be 2 parasites to blender and mixer. The mean *metacercariae* found and extracted from muscle

tissue were 0.2 (+0.357) and 1.2 (+0.963) for blender and mixer, respectively. The averages of *metacercariae* found and extracted from fish liver, in blender and mixer, were 24 (+15.145) and 18 (+8.246), respectively. The homogenization techniques for blender and mixer were effective for the extraction of *metacercariae* of mullet fish tissues, suggesting that they may be directly applicable in the field of study, especially due to the ease of testing.

KEYWORDS: Epidemiology, health management, homogenization, *Metacercariae*, *Mugil liza*.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve um grande aumento da procura e do consumo de pescado, bem como de seus derivados. Tal fato se constata pelo aumento do número de recintos comerciais que ofertam ao consumidor uma culinária exótica relacionada, por exemplo,   cultura oriental e sul-americana^{1,2}. A maior procura pelo pescado requer também um aumento em sua pesca e produção. No Brasil, as extensas faixas litorâneas e bacias hidrográficas facilitam a captura de diversas espécies de animais aqu ticos³. Atualmente, o país produz cerca de 1,25 milhões de toneladas de pescado, sendo 38% cultivado. Em nível mundial, a China mostrou-se como principal país produtor de pescado, com um total de 48 milhões de toneladas em 2008⁴. Em 2012, conforme informa es oficiais disponibilizadas pela FAO (*The State of World Fisheries and Aquaculture*), a produção pesqueira mundial atingiu cerca de 158 milhões de toneladas / ano⁵.

  possível observar um aumento *per capita* no consumo de pescado nas últimas décadas, ocorrido em todo o mundo. Nos anos 90, estimava-se um consumo de 14,4 kg, chegando a 16,4 kg em 2005. Em 2008, o consumo *per capita* do pescado já ultrapassava os 17 kg⁵. No Brasil, estima-se que o consumo esteja próximo a 8,0 kg⁶. De acordo com o já citado relatório da FAO, em 2012 o consumo *per capita* mundial de pescado atingiu a marca de 19,2 kg⁵.

Os peixes são hospedeiros ideais para uma grande quantidade de parasitas. Muitos estudos relatam diversos animais marinhos e de água doce portando variada fauna parasitária de protozoários e helmintos⁷. Dentre eles, diversos representantes são capazes de infectar o ser humano após ingestão, por exemplo, do pescado cru ou mal cozido. O número de casos de infecção do ser humano por parasitas de peixes em todo o mundo tem crescido consideravelmente. Tal fato pode ser

considerado decorrente, especialmente, da falta de logística dos sistemas de transporte, migrações humanas, mudanç as nos hábitos alimentares e negligências sanit rias^{1,2}.

Oliveira⁸ relata que, na década de 1990, 39 milhões de pessoas estavam infectadas por parasitas devido ao consumo de pescado. Tal fato influencia uma mudanç a no perfil epidemiológico das infecções e pode gerar grande impacto na saúde pública e, conseqüentemente, na economia dos pa ses^{9,10}. No Brasil, desde a década de 1990, casos de Ascocotilose (= Fagicolose) são relatados^{11,12}.

Dessa forma, o desenvolvimento de técnicas de pesquisa para extração e observação de parasitas de peixes, que aliem a praticidade no manuseio, a simplicidade de instrumentos e o baixo custo financeiro, contribui para o desenvolvimento da ciência e possibilita descrever melhor o perfil epidemiológico do problema aqui referido⁸.

A quantificação da carga parasitária e a extração de formas imaturas em tecidos comestíveis de pescados apresenta considerável importância, seja para o estudo da helmintofauna prevalente, ou mesmo para a avaliação do risco de se adquirir zoonoses. A amostragem e a diversidade de organismos parasitas pode estabelecer um gradiente de risco, colocando lotes, espécies e variedades de pescados ou de seus subprodutos sob vigilância de órgãos sanitários competentes. Para essas questões, a utilização de métodos aplicáveis em campo ou nos laboratórios e que apresentem melhores níveis de sensibilidade diagnóstica poderão padronizar metodologias e estabelecer técnicas e protocolos que ampliem a acurácia das determinações.

Com este trabalho, objetivou-se comparar a eficácia da extração de metacercárias de *Ascocotyle* sp (Trematoda: Digenea), de tecidos viscerais de *Mugil liza* Valenciennes, 1836 (Teleostei: Mugilidae), mediante duas diferentes

metodologias, além de evidenciar dados epidemiológicos de prevalência e densidade de metacercárias encontradas nas amostras de peixe coletadas.

MATERIAL E MÉTODOS

A espécie escolhida para o presente estudo foi um mugilídeo, popularmente conhecido como tainha *Mugil liza* Valenciennes, 1836 (Teleostei: Mugilidae), obtida no comércio do município de Iguape - SP (Figura 1). Esta região conta com um complexo estuarino onde os peixes mugilídeos são muito frequentes ao longo do ano, já que a região faz parte de sua rota migratória. Diversos estudos mostram frequentemente a presença de metacercárias de *Ascocotyle* sp. (Trematoda: Heterophyidae) em seus tecidos^{8, 13}.



Figura 1. Espécimes de *Mugil liza* utilizados no estudo (Tamanho da régua de escala: 30 cm. Foto: NAMBA, T. K.).

Os peixes foram adquiridos por meio de compras realizadas diretamente nos estabelecimentos comerciais da região e a coleta dos espécimes de *M. liza* ocorreu durante os meses de agosto de 2012 a maio de 2013. Os espécimes foram identificados com o auxílio dos trabalhos de Menezes¹⁴ e Menezes et al.¹⁵, que descreveram uma chave de classificação para as espécies do gênero *Mugil* do litoral brasileiro. Durante a coleta, os peixes apresentaram características organolépticas que permitiram confirmar estarem devidamente frescos e próprios para o consumo. Após a aquisição, as amostras foram devidamente armazenadas e transportadas em recipientes térmicos.

Utilizando-se a metodologia descrita por Citti¹⁶, após a coleta, foi feito o isolamento do fígado e de uma amostra de tecido muscular de cada exemplar. Durante a necropsia, foi efetuado um corte longitudinal na região ventral, desde a abertura cloacal até a região do coração. Em

seguida, um segundo corte foi realizado, formando um arco pela borda superior da cavidade abdominal até a altura do opérculo, para delimitar os órgãos e retirar o fígado.

Para a pesquisa do tecido muscular, padronizou-se uma mesma região no corpo do animal para a retirada da amostra, segundo metodologia proposta por Oliveira⁸. Um fragmento de aproximadamente 5x5 cm da musculatura foi retirado do lado esquerdo, na região próxima à abertura do opérculo, posterior à nadadeira peitoral. Fragmentou-se parcialmente a amostra da musculatura, que foi imediatamente transferida para uma placa de Petri.

As amostras de fígado e musculatura isoladas foram utilizadas para extração de metacercárias pelas técnicas da homogeneização por liquidificador e homogeneização por mixer. As técnicas de extração foram baseadas no trabalho de Oliveira⁸, com algumas modificações, como a utilização dos referidos processadores domésticos de alimentos.

Cerca de 5g do fígado e 300 mL de água filtrada foram homogeneizados em liquidificador semi-industrial (marca JBM, modelo JBM 59), por cerca de 10 segundos, em velocidade de 2000 RPM. A mistura, peneirada em malha de 0,07 mm, foi colocada em um cálice de sedimentação de 350 mL. A ressuspensão da mistura ocorreu em intervalos de 10 minutos para concentrar as metacercárias no fundo do cálice. O material sobrenadante foi retirado, quando, então, adicionou-se água filtrada ao sedimento. O processo foi repetido por até 3 vezes. A amostra de 5g de tecido muscular passou pelo mesmo procedimento, porém com um tempo de ressuspensão de 20 minutos.

Na homogeneização por mixer (aparelho marca Quimes, modelo Q250), 5g do fígado junto com 300 mL de água filtrada foram processados por cerca de 10 segundos, em velocidade de 1500 RPM. A mistura, peneirada em malha de 0,07 mm, foi acondicionada em um cálice de sedimentação de 350 mL. A ressuspensão da mistura ocorreu a intervalos de 10 minutos. O material sobrenadante foi retirado, quando, então, adicionou-se água filtrada ao sedimento. O processo foi repetido por até 3 vezes. O mesmo procedimento foi utilizado com os 5g de tecido muscular, padronizando-se um tempo de 20 minutos entre as ressuspensões.

Todo o material sedimentado, proveniente das duas técnicas de extração, foi analisado. Oliveira et al.¹⁷ relataram a eficiência e a

facilidade na identificação de metacercárias em amostras de vísceras e músculos por meio da realização de exame histopatológico, com auxílio de microscópio óptico. Dessa forma, pequenas porções do sedimento foram colocadas entre lâmina e lamínula e observadas por microscopia óptica, sob o aumento de 100x, visando-se identificar a presença de metacercárias. Com auxílio de um contador manual, realizou-se a contagem apenas das metacercárias encistadas e que se apresentaram íntegras à avaliação, baseando-se na estrutura das fases imaturas de *Ascocotyle* proposta por Simões et al (2010)¹⁸.

A partir dos resultados da contagem das metacercárias, a prevalência e densidade parasitária foram analisadas segundo Bush et al. (1997)¹⁹. A prevalência foi definida como o número de hospedeiros infectados por uma espécie de parasita pelo número de hospedeiros examinados, e a densidade foi definida como a quantidade de parasitas presentes em um hospedeiro ou em determinada área, peso ou volume de seus tecidos. O teste de normalidade de *Kolmogorov Smirnov* foi empregado para avaliar a distribuição dos dados, utilizando-se o programa *Sigma Stat* versão 3.5. Como os dados apresentaram distribuição paramétrica, a comparação entre o número de parasitas encontrados em cada tecido foi realizada utilizando-se o teste *t* pareado. Adicionalmente, uma metodologia de análise gráfica proposta por

Bland e Altman (*Bland-Altman graphical analysis*)²⁰ foi utilizada para avaliar a concordância entre os dois métodos de extração utilizados, plotando-se as diferenças entre as contagens de parasitas obtidos com os dois métodos de extração, contra as médias de ambos os valores. Os limites desta concordância estão contidos no intervalo entre a diferença média observada entre ambos os métodos acrescida ou subtraída de 1,96 desvios-padrão (média das diferenças \pm 1,96 DP).

RESULTADOS

O presente estudo utilizou um total de 26 amostras, sendo 16 amostras de fígado e 10 de tecido muscular, todas provenientes de peixes mugilídeos, consistindo de espécimes de *Mugil liza* Valenciennes, 1836 (Teleostei: Mugilidae).

As análises das extrações de metacercárias, tanto por liquidificador quanto por mixer, permitiram identificar maior número de parasitas nas amostras de fígado, se comparadas ao número de parasitas observados nas amostras de tecido muscular. Todos os peixes coletados estavam infectados por metacercárias de trematódeos *Ascocotyle* sp. Ainda, todas as amostras de fígado coletadas separadamente também se mostraram infectadas. Cerca de 70% das amostras de tecido muscular mostraram-se infectadas (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Número e densidade de metacercárias de trematódeos extraídas de 5g de tecido muscular de espécimes de *Mugil liza* pelas técnicas da homogeneização em liquidificador e mixer

Amostra	Liquidificador		Mixer	
	Parasitas	Densidade	Parasitas	Densidade
1	0	0	0	0
2	0	0	1	0,2
3	0	0	1	0,2
4	0	0	1	0,2
5	0	0	2	0,4
6	0	0	0	0
7	1	0,2	1	0,2
8	0	0	0	0
9	0	0	4	0,8
10	1	0,2	2	0,4
Média	0,2	0,06	1,2	0,34
Desvio-padrão	\pm 0,357	\pm 0,09	\pm 0,963 (p<0,05)	\pm 0,22 (p<0,05)

Em relação às amostras de tecido muscular analisadas, a maior quantidade encontrada foi de 4

parasitas (densidade parasitária de 0,8 parasitas em cada 5g), na extração por mixer. Dentre as amostras

positivas, a menor quantidade encontrada foi de 1 parasita (densidade parasitária de 0,2 parasitas em cada 5g), em liquidificador e mixer. Algumas amostras não apresentaram metacercárias em 5g de tecido analisado. As médias de metacercárias encontradas e extraídas de tecido muscular por liquidificador e mixer foram de 0,2 (+0,357) e 1,2

(+0,963), respectivamente. Em média, a extração por mixer identificou quantidade de parasitas significativamente maior do que a extração por liquidificador, o que refletiu também em aumento estatisticamente significativo na densidade dos parasitas observados nas amostras inspecionadas (Tabela 1).

Tabela 2. Número e densidade de metacercárias de trematódeos extraídas de 5g do fígado de espécimes de *Mugil liza* pelas técnicas da homogeneização em liquidificador e mixer

Amostra	Liquidificador		Mixer	
	Parasitas	Densidade	Parasitas	Densidade
1	13	2,6	13	2,6
2	4	0,8	2	0,4
3	46	9,2	21	4,2
4	36	7,2	23	4,6
5	41	8,2	24	4,8
6	2	0,4	3	0,6
7	14	2,8	11	2,2
8	22	4,4	12	2,4
9	9	1,8	16	3,2
10	15	3	18	3,6
11	35	7	34	6,8
12	42	8,4	33	6,6
13	19	3,8	15	3
14	6	1,2	12	2,4
15	36	7,2	27	5,4
16	44	8,8	24	4,8
Média	24	4,8	18	3,6
Desvio-padrão	$\pm 15,1$	$\pm 3,1$	$\pm 9,3$	$\pm 1,9$
			($p < 0,05$)	($p < 0,05$)

A extração de metacercárias em amostras de fígado, por homogeneização em liquidificador, apresentou um total de até 46 parasitas (densidade parasitária de 9,2 parasitas a cada 5g). A menor quantidade encontrada foi de 2 parasitas (densidade parasitária de 0,4 parasitas em cada 5g), tanto em liquidificador quanto em mixer. As médias de metacercárias encontradas e extraídas do fígado, por liquidificador e mixer, foram de 24 ($\pm 15,1$) e 18 ($\pm 8,246$), respectivamente. Em média, a extração por mixer encontrou um número de parasitas significativamente menor do que a extração por liquidificador, o que refletiu também em redução estatisticamente significativa na densidade dos parasitas observados nas amostras inspecionadas (Tabela 2).

Na avaliação dos resultados provenientes dos testes de comparação de médias, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os dois métodos de extração testados, tanto para o número de parasitas quanto para suas densidades, em ambos os tipos de tecido avaliados. Tais resultados foram confirmados pela análise gráfica de *Bland-Altman*,

que podem ser visualizadas nas Figuras 2, 3, 4 e 5. Por esta análise, os dois métodos poderiam ser considerados concordantes apenas se os valores das diferenças entre os métodos comparados estivessem situados próximos ao valor zero^{20, 21}, o que efetivamente não pôde ser observado no presente estudo.

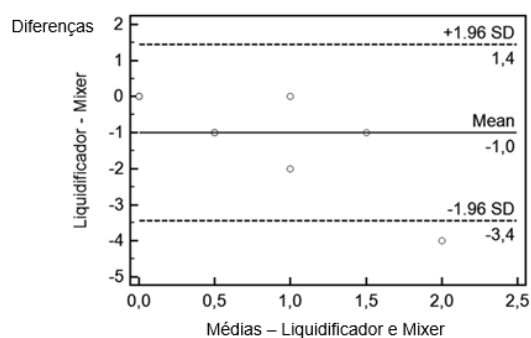


Figura 2. Comparação entre as diferenças e as médias do número de parasitas encontrados utilizando-se ambos os métodos de extração de metacercárias em amostras de musculatura

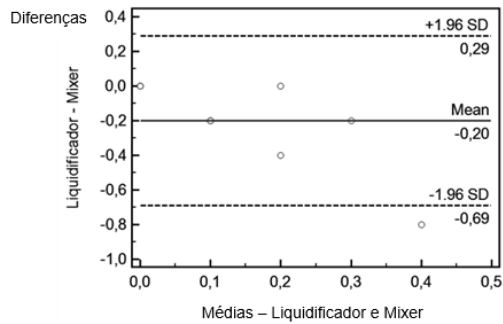


Figura 3: Comparação entre as diferenças e as médias da densidade de parasitas encontrados utilizando-se ambos os métodos de extração de metacercárias em amostras de musculatura

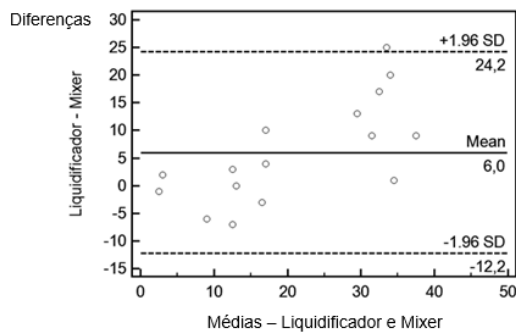


Figura 4: Comparação entre as diferenças e as médias do número de parasitas encontrados utilizando-se ambos os métodos de extração de metacercárias em amostras de fígado

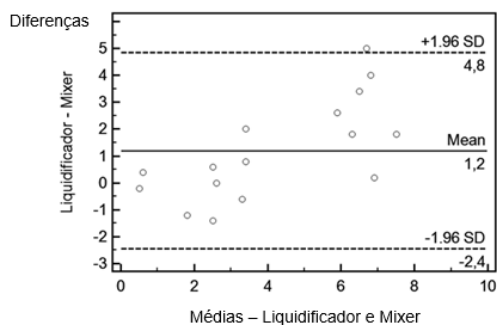


Figura 5: Comparação entre as diferenças e as médias da densidade de parasitas encontrados utilizando-se ambos os métodos de extração de metacercárias em amostras de fígado

DISCUSSÃO

O presente trabalho relatou a existência de metacercárias em todos os peixes coletados no comércio do município de Iguape - SP. Este resultado se assemelha aos relatados por Almeida e Woiciechovski (1994)²² e Oliveira et al. (2007)¹⁷,

que também identificaram a presença de parasitas em todos os exemplares de peixes mugilídeos capturados no Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Ilha Comprida - SP. Alta prevalência parasitária também foi observada em outros países. Gálvan-Borja et al. (2010)²³ demonstraram a existência de *Ascocotyle (Phagicola) longa* em mais de 90% de mugilídeos capturados na região da baía de Cartagena, na Colômbia.

A utilização apenas de amostras de fígado mostrou ser eficiente para a recuperação de metacercárias, embora alguns autores relatem pesquisas realizadas em “pool de vísceras”, sendo o fígado apenas um componente desse material^{17, 22, 24}. Estudos sobre frequência e densidade de metacercárias em tecido muscular de mugilídeos têm importância zoonótica, pois é a parte comumente utilizada na alimentação humana. Neste estudo, foram encontradas até 4 metacercárias em 5g de tecido muscular. Assim sendo, ao ingerir uma porção de carne de peixe (tipo filé) pesando ao menos 100g, é possível ingerir até 80 metacercárias.

O presente estudo utilizou a homogeneização por liquidificador e por mixer como técnicas de extração de metacercárias dos tecidos de peixes mugilídeos. Embora os testes estatísticos de comparação entre as médias de parasitas nos tecidos tenham revelado diferenças significativas relacionadas à sensibilidade de detecção proporcionada por ambos os métodos, diferenças essas confirmadas pela análise gráfica de Bland e Altman, ambas as técnicas mostraram-se eficientes na extração de metacercárias do fígado e tecido muscular. Sendo o liquidificador um método de menor custo e de fácil utilização em campo, ele poderá substituir o mixer em análises semelhantes às propostas no presente relato.

É importante reconhecer que o número de espécimes analisados foi pequeno e que estes animais eram provenientes apenas de uma única região da costa brasileira. Dessa forma, sugere-se que novos estudos, com uma amostra maior, e realizados em diferentes pontos ao longo da costa, sejam feitos com o intuito de verificar se o fenômeno observado neste trabalho poderá se repetir em maior escala e se existirão diferenças, especialmente com relação ao número de metacercárias encontradas em indivíduos de diferentes regiões e até de espécies diferentes.

CONCLUSÃO

Levando-se em consideração as diferenças estatisticamente significantes tanto no número de parasitas detectados quanto na densidade desses parasitas, os resultados deste trabalho permitem

concluir que a homogeneização por liquidificador apresenta maior sensibilidade na detecção de parasitas em fígado, assim como a homogeneização por mixer apresenta maior sensibilidade na detecção de parasitas em tecido muscular. Na prática, ambas as técnicas de homogeneização mostraram-se eficazes para extração de metacercárias dos tecidos de peixes mugilídeos, sugerindo que podem se aplicáveis diretamente no campo de estudo, especialmente pela facilidade de realização do ensaio. Peixes mugilídeos coletados no município de Iguape - SP apresentaram-se infectados por metacercárias de trematódeos, o que os coloca em situação de risco e mostra a endemicidade da infecção helmíntica nessa população. O consumo em grandes quantidades e a falta de uma ação contundente de vigilância sanitária no tangente ao controle de qualidade dos insumos, comercialização e distribuição desses peixes, pode fazer com que essa helmintose venha apresentar um caráter emergente na população consumidora, caracterizando uma condição de interesse de saúde pública.

REFERÊNCIAS

1. Chai J-Y, Darwin Murrell K, Lymbery AJ. Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues. *International Journal for Parasitology*. 2005;35(11):1233–54.
2. Emmel VE, Inamine E, Secchi C, Brodt TC, Amaro MCO, Cantarelli VV, et al. *Diphyllbothrium latum*: relato de caso no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2006;39(1):82–4.
3. Cerdeira RGP, Ruffino ML, Isaac VJ. Consumo de pescado e outros alimentos pela população ribeirinha do lago grande de Monte Alegre, PA. Brasil. *Acta Amazonica*. 1997;27(3):213–28.
4. Nomura I. O futuro da pesca e da aquicultura marinha no mundo. *Ciênc Cult*. 2010;62(3):28–32.
5. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). The state of world fisheries and aquaculture. 2014. Disponível em <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>
6. Cavalli R, Ferreira J. O futuro da pesca e da aquicultura marinha no Brasil: a maricultura. *Ciênc Cult*. 2010;62(3):38–9.
7. Poulin R, Morand S. The diversity of parasites. *Quarterly Review of Biology*. 2000;277–93.
8. Oliveira SAL. Pesquisa de helmintos em musculatura e serosa abdominal de peixes de importância comercial capturados no litoral norte do Brasil [Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)]. Belém: Universidade Federal do Pará; 2005. Available from: http://cienciaanimal.ufpa.br/pdfs/CA_Ciencia_Animal/CA_SILVIO_ABNER_LAMEIRA_DE_OLIVEIRA.pdf
9. Semenas L, Kreiter A, Urbanski J. New cases of human diphyllbothriosis in Patagonia, Argentine. *Revista de Saúde Pública*. 2001;35(2):214–6.
10. Silva ML da, Matté GR, Matté MH. Aspectos sanitários da comercialização de pescado em feiras livres da cidade de São Paulo, SP/Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2008;67(3):208–14.
11. Chieffi PP, Leite OH, Dias RMDS, Torres DMAV, Mangini ACS. Human parasitism by *Phagicola* sp (Trematoda, Heterophyidae) in Cananéia, São Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1990;32(4):285–8.
12. Chieffi PP, Gorla MCO, Vieira Torres D, Souza Dias R, Mangini ACS, Monteiro AV, et al. Human infection by *Phagicola* sp.(Trematoda, Heterophyidae) in the municipality of Registro, São Paulo State, Brazil. *Journal of tropical medicine and hygiene*. 1992;95(5):346–8.
13. Okumura MPM, de Pérez ACA, Espíndola Filho A. Principais zoonoses parasitárias transmitidas por pescado-revisão. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia* [Internet]. 1999;2(2). Available from: <http://revistas.bvs-vet.org.br/recmvz/article/view/3386>
14. Menezes NA. Guia prático para conhecimento e identificação das tainhas e paratis (Pisces, Mugilidae) do litoral brasileiro. *Revista Brasileira de Zoologia*. 1983;2(1):1–12.
15. Menezes NA, De Oliveira C, Nirchio M. An old taxonomic dilemma: the identity of the western south Atlantic lebranche mullet (Teleostei: Perciformes: Mugilidae). *Zootaxa*. 2010;2519:59–68.
16. Citti AL. Tainhas (*Mugil liza valenciennes*, 1836) infectadas por *Ascocotyle* (*Phagicola*) *longa* em São Paulo: ocorrência, importância na saúde pública, estratégias de controle e sua representatividade cultural. [Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada a Zoonose)]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Available from: <http://www.sovergs.com.br/site/38conbravet/resumos/363.pdf>
17. Oliveira SA de, Blazquez FJH, Antunes SA, Maia AAM. *Ascocotyle* (*Phagicola*) *longa* Ransom, 1920 (Digenea: Heterophylidae) metacercariae, in *Mugil platanus* in estuarin of Cananéia, SP, Brazil. *Ciência Rural*. 2007;37(4):1056–9.
18. Simões SBE, Barbosa HS, Santos CP. The life cycle of *Ascocotyle* (*Phagicola*) *longa* (Digenea: Heterophyidae), a causative agent of fish-borne trematodosis. *Acta tropica*. 2010;113(3):226–33.
19. Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *The Journal of Parasitology*. 1997;575–83.
20. Martin Bland J, Altman D. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical

measurement. The lancet. 1986;327(8476):307–10.

21. Hirakata VN, Camey SA. Análise de concordância entre métodos de Bland-Altman. Revista HCPA. 2009;29(3):261-268.

22. Almeida-Dias ER, Woiciechowski E. Ocorrência da *Phagicola longa* (Trematoda: Heterophyidae) em mugilídeos e no homem, em Registro e Cananéia, SP. Hig Alim. 1994;8:43–6.

23. Galván-Borja D, Olivero-Verbel J, Barrios-García L. Occurrence of *Ascocotyle* (*Phagicola longa* Ransom, 1920 (Digenea: Heterophyidae) in *Mugil incilis* from Cartagena Bay, Colombia. Veterinary parasitology. 2010;168(1):31–5.

24. Antunes SA, Almeida Dias E. *Phagicola longa* (Trematoda: Heterophyidae) em mugilídeos estocados resfriados e seu consumo cru em São Paulo–SP. Higiene Alimentar. 1994;8(31):41.

Protocolado em: 04 fev. 2014. Aceito em: 16 jul. 2014