

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATO
GROSSO**

CAMPUS CUIABÁ – BELA VISTA

DEPARTAMENTO DE ENSINO

CURSO DE BACHARELADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ERIKA CERQUEIRA SANTOS

**FERRAMENTAS MOLECULARES NA ANÁLISE DAS PRINCIPAIS BACTÉRIAS
PATOGENICAS EM PEIXES COMERCIALIZADOS NA BAIXADA CUIABANA,
MATO GROSSO.**

**Cuiabá - MT
Março\ 2016**



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATO GROSSO

CAMPUS CUIABÁ – BELA VISTA

DEPARTAMENTO DE ENSINO

CURSO DE BACHARELADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ERIKA CERQUEIRA SANTOS

FERRAMENTAS MOLECULARES NA ANÁLISE DAS PRINCIPAIS BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM PEIXES COMERCIALIZADOS NA BAIXADA CUIABANA, MATO GROSSO.

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao curso de Bacharelado em Engenharia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Estado de Mato Grosso Campus Cuiabá – Bela Vista, orientado pela Prof^ª: Dr^ª. Sandra Mariotto.
Co-orientadora: Débora Cristina Pastro

**Cuiabá - MT
Março \ 2016**

Divisão de Serviços Técnicos. Catalogação da Publicação na Fonte. IFMT Campus Cuiabá
Bela Vista
Biblioteca Francisco de Aquino Bezerra

S237f

Santos, Erika Cerqueira.

Ferramentas moleculares na análise das principais bactérias patogênicas em peixes comercializados na baixada cuiabana, Mato Grosso./ Erika Cerqueira Santos._ Cuiabá, 2016.

26 f.

Orientadora: Prof^a. Dra Sandra Mariotto

Coorientadora: Prof^a. Msc. Débora Cristina Pastro

TCC (Graduação em Engenharia de Alimentos). Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Mato Grosso.

1. Pescados – TCC. 2. Contaminação – TCC. 3. DNA – TCC. I. Mariotto, Sandra. II. Pastro, Débora Cristina. III. Título.

IFMT CAMPUS CUIABÁ BELA VISTA

CDU 639.3.05
CDD 664.94

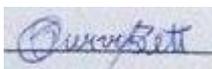
**FERRAMENTAS MOLECULARES NA ANÁLISE DAS PRINCIPAIS BACTÉRIAS
PATOGENICAS EM PEIXES COMERCIALIZADOS NA BAIXADA CUIABANA,
MATO GROSSO.**

Trabalho de Conclusão de Curso em BACHARELADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS, submetido à Banca Examinadora composta pelos Professores do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso Campus Cuiabá Bela Vista como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Graduado.

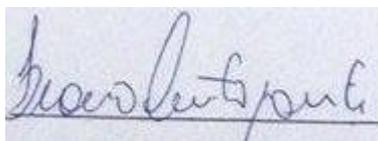
Aprovado em:



Profª Drª. Sandra Mariotto (Orientadora) – IFMT Cuiabá – Bela Vista



Msc. Simone Curvo Bett (Membro da Banca) – LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Mato Grosso



Profº Drº. Liano Centofante (Membro da Banca) – UFMT - Universidade Federal de Mato Grosso – campus Cuiabá

**Cuiabá - MT
Março \ 2016**

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos, minha cunhada e meus sobrinhos, sem os quais não haveria a possibilidade de realizá-lo. Obrigada pelo incentivo, apoio, conselhos, carinhos, investimento e dedicação. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele eu não teria conseguido chegar até aqui. Agradecer por ter colocado pessoas excelentes no meu caminho, com as quais aprendi coisas valiosas que carregarei por toda a vida.

À minha família, pelo apoio e incentivo de sempre, principalmente pelo empenho dos meus pais, que são os responsáveis pela concretização dessa etapa.

À professora Dra Sandra Mariotto e a mestrande Débora Cristina Pastro, pela oportunidade, paciência, carinho, conselhos, dedicação e por todo o suporte necessário para o desenvolvimento do projeto.

Aos meus amigos, por sempre acreditarem em mim, até mesmo nas horas que eu não acreditava e por estarem sempre ao meu lado.

Aos Professores Doutores Liano Centofante, Paulo César Venere e Daniela Ferreira, do Instituto de Biociências, pela cooperação e pelo suporte durante o período de realização do projeto. A UFMT pela estrutura física oferecida e a todos do laboratório de genética animal da UFMT, onde foi realizado o trabalho.

A professora Dra Selma Baia Batista pelo estágio nas fases iniciais e por todos que estiveram envolvidos direta ou indiretamente e que contribuíram de alguma forma, para o meu crescimento pessoal e profissional.

A vocês, Muito Obrigada!

SUMÁRIO

1. Introdução	10
2. Material e Métodos	12
2.1. Material	12
2.2. Metodologia experimental	12
2.2.1. Cultivo das bactérias.....	12
2.2.2. Extração de DNA	13
2.2.3. Reação em cadeia polimerase (PCR).....	14
3. Resultados	15
4. Discussão.....	17
5. Considerações finais	20
6. Referências	21
7. Anexos	25



FERRAMENTAS MOLECULARES NA ANÁLISE DOS PRINCIPAIS MICROORGANISMOS PATOGENICOS EM PEIXES COMERCIALIZADOS NA BAIXADA CUIABANA, MATO GROSSO.

¹SANTOS, Erika Cerqueira; ²PASTRO, Débora Cristina; ³MARIOTTO, Sandra.

RESUMO

O pescado é um alimento saudável, rico em proteínas, ácidos graxos insaturados, vitaminas e minerais, porém é altamente suscetível a deterioração, devido a sua composição química e o pH próximo a neutralidade, favorecendo o desenvolvimento microbiano. Objetivou-se com esse trabalho avaliar a qualidade microbiológica, utilizando ferramenta de biologia molecular para detectar a presença de bactérias patogênicas nos peixes cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e no híbrido tambatinga comercializados na baixada cuiabana. A pesquisa foi realizada com amostras de espécimes coletadas em feiras do município de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. Os peixes foram encaminhados ao laboratório de genética animal da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) campus Cuiabá, onde fez-se a homogeneização das amostras em água peptonada estéril a 0,1% e a propagação das bactérias presentes no tecido do peixe em caldo Infusão cérebro e coração (BHI), extração do DNA bacteriano e quantificação, sendo o resultado verificado em equipamento com luz ultra violeta. Realizou-se também a amplificação do DNA extraído através da técnica de PCR (Reação em cadeia de polimerase) com *primers* espécie específicos. Os produtos foram analisados em gel de agarose a 1,5%, visualizados em transiluminador com luz Ultra Violeta (UV) e fotodocumentados para análise. Os resultados demonstraram a presença de *Salmonella spp* em 2 amostras de cacharas e em 1 de pacu, *Escherichia coli* em 3 amostras de pacus e 6 de cacharas e ausência de *Shigella ssp* e *Staphylococcus aureus* em todas as amostras coletadas.

Palavras-chave: Pescados, contaminação, DNA.

¹Graduanda em Engenharia de Alimentos; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, Campus Cuiabá – Bela Vista; erika.ecs809@gmail.com

²Mestranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, Campus Cuiabá - Bela Vista; debora_pastro@hotmail.com

³Doutora em Genética e Evolução; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, Campus Cuiabá - Bela Vista; sandra.mariotto@blv.ifmt.edu.br

ABSTRACT

The fish is a healthy food, rich in proteins, unsaturated fatty acids, vitamins and minerals, however it is highly susceptible to deterioration due to its chemical composition and pH near neutrality, favoring microbial growth. It is aimed with the search evaluate the microbiological quality using molecular biology tool for detecting the presence of pathogenic bacteria in the species of fish cachara (*fasciatum Pseudoplatystoma*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and hybrid tambatinga marketed in Cuiaba. The search it was made with samples species collected at fairs in the city of Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. The fish were sent to animal genetics laboratory of the Federal University of Mato Grosso (UFMT) Campus Cuiabá, where it is the homogenization of the samples in sterile 0.1% peptone water and propagation of bacteria in the fish tissue in brain heart infusion broth (BHI), extraction of bacterial DNA and quantification, with the score on equipment with ultra violet light. also performed amplification of the extracted DNA by PCR (polymerase chain reaction) species with specific primers. The products were analyzed on agarose gel 1.5%, visualized in UV light transilluminator (UV) and photodocumented for analysis. The results showed the presence of *Salmonella* spp in 2 samples cacharas and 1 pacú, *Escherichia coli* in 3 samples pacus and 6 cacharas and absence of *Shigella* ssp and *Staphylococcus aureus* in all the collected samples.

Keywords: Fish, contamination, DNA.

1. Introdução

O Brasil apresenta vantagens para o desenvolvimento da aquicultura e da pesca extrativista, por possuir uma grande disponibilidade de áreas cultiváveis em águas marinhas e rios, associadas às condições ambientais e climatológicas altamente favoráveis ao desenvolvimento da atividade pesqueira (PINHEIRO et al., 2014). Devido a isso, o potencial de crescimento é enorme e o país pode se tornar um dos maiores produtores mundiais de pescados (KUBITZA, 2007). Há estimativas de que a produção nacional atinja 20 milhões de pescados/ano em 2030 (PINHEIRO et al., 2014).

A produção brasileira de pescados atingiu em 2011 pouco mais de 1,4 milhão de toneladas, conforme os números do Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura do Ministério da Pesca (MPA, 2011). Deste total, 628.704 toneladas foram produzidas em cativeiro. Em 2013, o Brasil produziu 1.241.807 toneladas sendo que, 765.288 toneladas foram de origem da pesca natural doméstica (61,6%) e 476.519 toneladas foram de origem da aquicultura em cativeiro (38,4%) (MPA, 2015).

O Estado de Mato Grosso produziu em 2011 aproximadamente 49 mil toneladas de peixes cultivados em água doce, sendo o terceiro maior produtor nacional e o maior produtor na região Centro-Oeste (MAPA, 2011) e, em 2013, sua produção atingiu aproximadamente 75 mil toneladas. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014), o Estado foi responsável por 19,3% da produção total da piscicultura do país, que foi de 392.492 toneladas.

Porém, o aumento da atividade aquícola em corpos de água doce aumenta o risco de epidemias causadas por bactérias patogênicas, por modificar o ambiente natural dos organismos aquáticos (COSTA, 2003).

O Pantanal de Mato Grosso destaca-se por ser a maior zona úmida tropical do mundo, sendo a pesca muito praticada por um grande contingente de pessoas, desde indígenas até moradores urbanos (OLIVEIRA, et al., 2000). Esta prática favorece a inserção de patógenos nesse ambiente, influenciando na qualidade final dos peixes. As espécies de maior interesse econômico do Pantanal são: o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) e pacu-pevas (*Metynnis spp.*) (OLIVEIRA, et. al. 2000).

O pescado é uma das principais fontes de proteínas na alimentação humana e a partir dele, obtêm-se subprodutos como óleos e rações de valor para a indústria (ORDÓÑEZ et al., 2005). É também rico em vitaminas, ácidos graxos insaturados e minerais, que ajudam na prevenção de doenças como Alzheimer e distúrbios do sono. Apesar desses benefícios, é um alimento altamente suscetível a deterioração, devido a sua composição química e, sobretudo, o pH próximo a neutralidade, o que favorece o desenvolvimento microbiano (FRANCO, LANDGRAF, 2008).

Na deterioração dos pescados, merecem destaque as bactérias patogênicas da família *Enterobacteriaceae* (*Salmonella spp*, *Shigella ssp*, *E. coli*) que ocorrem em produtos do pescado como resultado da contaminação fecal ou da poluição das águas naturais ou de ambientes aquáticos, onde estes organismos podem sobreviver durante um longo período (meses), ou à contaminação direta dos produtos durante o processamento (HUSS, 1997).

Sendo assim, é imprescindível a verificação de microrganismos patogênicos em alimentos, havendo a necessidade de empregar métodos rápidos e eficientes para tal finalidade. Uma das técnicas de biologia molecular que tem sido utilizada é Reação em Cadeia de polimerase (PCR), que tem se mostrado muito eficiente, aumentando a confiabilidade da análise e reduzindo custos e tempo de trabalho. O método da Reação em Cadeia de Polimerase – PCR utiliza *primers* flanqueadores de regiões do DNA espécie-específico, amplificando o material genético num processo que consiste de três etapas: desnaturação, anelamento e extensão, repetidos em 30 ciclos, onde é possível se obter bilhões de cópias desta região específica e visualiza-la em gel.

- ✓ Na etapa de desnaturação, a temperatura é elevada e ocorre a quebra das ligações pontes de hidrogênio, que une a estrutura helicoidal do DNA, ficando duas fitas simples;
- ✓ No anelamento, ocorre a diminuição da temperatura e a ligação dos *primers* nas novas cadeias, delimitando a região gênica de interesse (os *primers* são utilizados em pares devido a polaridade das extremidades das cadeias serem diferentes, ou seja, na extremidade 3' há um grupo hidroxil e na extremidade 5', um grupo fosfato);
- ✓ Na última etapa, que é a extensão, a temperatura aumenta um pouco para que ocorra a ligação da enzima *Taq DNA polimerase* que vai

auxiliar na ligação dos desoxirribonucleotídeos (DNTP's), fazendo a extensão das novas cadeias formadas.

Objetivou-se com esse trabalho avaliar as condições higiênico-sanitárias do pescado, utilizando ferramenta da biologia molecular (PCR) para detectar a presença de bactérias patogênicas em três espécies de peixes: cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e do híbrido tambatinga (*C. macropomum* x *P. brachypomus*), resultado do cruzamento induzido entre a fêmea do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e o macho da pirapitinga (*Piaractus brachypomus*), comercializadas na baixada cuiabana.

2. Material e Métodos

2.1. Material

A pesquisa foi realizada com 24 amostras, sendo 12 dos peixes cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*), 8 de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e 4 com o híbrido tambatinga (*C. macropomum* x *P. brachypomus*), coletados em duas feiras em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. Foram coletados 25g de tecido dos peixes resfriados. As espécies utilizadas na pesquisa são originárias de diversos lugares da bacia do Alto Paraguai, dos rios Cuiabá e Paraguai, bem como de pisciculturas locais. Após coletadas, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis, colocadas em caixas térmicas com bolsas de gelo e encaminhadas diretamente para o laboratório de Genética animal da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Campus Cuiabá.

2.2. Metodologia experimental

2.2.1. Cultivo das bactérias

De acordo com o protocolo da American Public Health Association (APHA) 2001, cada amostra foi colocada em 225 mL de água peptonada a 0,1% estéril, homogeneizadas e, em seguida, alíquotas 0,1 mL (100 µL) foram colocadas em microtubos contendo 150 µL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 18 horas.

Após, os tubos foram retirados da estufa para que se fizesse a extração do DNA bacteriano.

2.2.2. Extração de DNA

Para a extração do DNA, utilizou-se o kit de extração RTP® Bactéria DNA Mini Kit (STRATEC Molecular) e seguiu-se o protocolo de extração do fabricante, com adaptações. Os procedimentos de extração detalhados foram:

- a) Retirar 0,1 mL (100 µL) do caldo BHI enriquecido das culturas e transferir para o tubo de extração, adicionar 400 µl do tampão de ressuspensão e deixar incubar por 10 minutos a 37°C em banho Maria. Depois incubar por mais 10 minutos a 65°C e por mais 5-10 minutos a 95°C em banho Maria.
- b) Acrescentar 400 µl do tampão de ligação B6, misturar no vórtex;
- c) Transferir para o filtro de rotação e deixar em repouso por 01 minuto a temperatura ambiente;
- d) Centrifugar por 02 minutos a 8000 rpm;
- e) Acrescentar 500 µl de tampão de lavagem 1 no filtro de rotação e centrifugar por 01 minuto a 8000 rpm, descartando o líquido filtrado após a centrifugação;
- f) Transferir o filtro para outro tubo estéril e acrescentar 600 µl de tampão de lavagem 2. Centrifugar durante 01 minuto a 8000 rpm, descartando o filtrado;
- g) Centrifugar novamente, por 04 minutos a 11000 rpm, para total remoção de resíduos do tampão de lavagem 2;
- h) Descartar o tubo onde fez-se as lavagens e colocar o filtro em um tubo de 1,5 mL, estéril. Pipetar 150 µl de tampão de eluição colocando-o no centro do filtro. Deixar incubar por 10 minutos a temperatura ambiente para ressuspender o DNA;
- i) Centrifugar por 04 minuto a 11000 rpm para desprender o DNA da membrana, descartando o filtro e armazenando o filtrado contendo o DNA em refrigerador ou freezer -20°C, imediatamente.

Depois de extraído o DNA bacteriano, foi feita a corrida eletroforética em gel de agarose a 1%; contendo alíquotas de 1µl de DNA, 1µl do fluoróforo *gelred*, 1µl do corante azul de bromofenol e comparado com um *ladder* com bandas de peso molecular previamente conhecidas (100 pares de bases), para verificar se a extração do DNA foi eficiente. A corrida foi conduzida em tampão Tris-Borato-EDTA

(TBE) 1X a 120 V por 30 minutos, visualizados em transiluminador com luz Ultra Violeta (UV) e fotodocumentados.

2.2.3. Reação em cadeia polimerase (PCR)

Para a PCR foram utilizados *primers* específicos para quatro tipos de bactérias: *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Shigella ssp* e *Staphylococcus aureus*, como mostra o quadro 1.

Quadro 1: Desenho dos *primers* utilizados

Bactéria	Desenho do primer	Amplificação	Fonte
<i>Staphylococcus aureus</i>	NUC1 5´ ATG AAG TCA AAT AAA TCG CT NUC2 3´ TTT GGT GAA AAA TAC TTC TC	458 pb	GANDRA, 2006
<i>Salmonella spp</i>	SAF: 5´ TTG GTG TTT ATG GGG TCG TT SAR: 3´ GGG CAT ACC ATC CAG AGA AA	298 pb	SUH; SONG, 2005
<i>Escherichia coli</i>	GapA for 5´ GTT GTC GCT GAA GCA ACT GG GapA rev: 3´ AGC GTT GGA AAC GAT GTC CT	171 pb	BLUMER, 2005
<i>Shigella ssp</i>	Ipall for 5´ GTTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC ipalV rev 3´ GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	620 pb	SONG, 2005

O DNA extraído foi quantificado com uso do DS -11 nanoespectrofotometro e em seguida feita a PCR. Em cada amplificação foram incluídos controles positivo (DNA de cepa pura certificada) e negativo (mistura da reação sem DNA). O volume final da reação da PCR foi de 25 µL, contendo 1µL de DNA (20 ng), 0,5 µL de DNTP (10 mM), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (1 U), 1,0 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (10 µM) e 2,5 µL de tampão (10X). As condições de amplificação foram: um período de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificação, sendo que cada ciclo consistiu de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 50°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Depois de completados os 30 ciclos de amplificação, houve o período de extensão final a 72°C por 7 minutos e a reação foi interrompida automaticamente por resfriamento a 12°C até a aplicação em gel de agarose para a

corrida de eletroforese horizontal. Posteriormente, foi armazenado a -20°C.

Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose a 1,5% corados com o fluoróforo *gelred* da Uniscience, corante azul de bromofenol e DNA com bandas de peso molecular previamente conhecidas (*ladder* 100 pares de bases). A corrida conduzida em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X a 120 V por 40 minutos, visualizados em transiluminador com luz Ultra Violeta (UV) e fotodocumentados para análise.

3. Resultados

Baseado nos resultados obtidos via PCR, foi possível analisar se havia a presença de bactérias patogênicas em cacharas, pacu e no híbrido tambatinga. As bactérias foram pesquisadas através de análise qualitativa utilizando os *primers* marcadores, espécie específico e os resultados estão apresentados na tabela 1 e na figura 1.

Tabela 1: Resultados das análises para cada bactéria.

Espécies Bactérias	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella spp</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Escherichia coli</i>
Cachara	Ausente em todas as amostras	Presente em 2 amostras	Ausente em todas as amostras	Presente em 6 amostras
Tambatinga	Ausente em todas as amostras			
Pacu	Ausente em todas as amostras	Presente em 1 amostra	Ausente em todas as amostras	Presente em 3 amostras

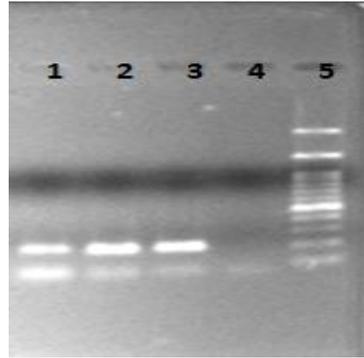


Figura 1: Gel de agarose a 1,5% na proporção de 1:1 contendo *amplicons* de PCR para identificar a presença de *Escherichia coli*. Onde: 1, 2 e 3 são os DNA's de *E. coli* encontrados nos peixes, 4 é o controle negativo e o 5 é o Ladder (marcador) de peso molecular 100 Bp.

Para *Staphylococcus aureus* e *Shigella ssp* os resultados foram satisfatórios, estando ausentes em 100% das amostras de todas as espécies, indicando que não houve falha de caráter higiênico sanitário. Porém, para *Salmonella spp* o resultado demonstrou que havia presença desse microrganismo em duas espécies de peixes (pacu e cachara) e, conforme o previsto na legislação da ANVISA, essa bactéria deve estar ausente a cada 25 gramas da carne do pescado e se detectada, esse alimento está impróprio para o consumo humano.

Para *E. Coli* os resultados também deram positivos para as duas espécies citadas anteriormente, indicando que essa contaminação pode ter ocorrido pela água, que provavelmente poderia estar contaminada por fezes, durante o transporte, armazenamento inadequado e manipulação, devido essa bactéria não fazer parte da microbiota natural do peixe. A provável contaminação desse animal pela água, pode ter ocorrido por esgotos domésticos e industriais, nas espécies provenientes de rio (pacu e cachara). Já em tambatinga estava ausente devido ser um peixe proveniente de cativeiro e não ser manipulado e provavelmente não haver a presença de outros animais próximos ao criatório.

Não se pode afirmar que as amostras estavam impróprias para consumo, exceto no caso das amostras de cachara e pacu que estavam contaminadas com *Salmonella spp.*, uma vez que a legislação da ANVISA estabelece que deve estar ausente. No caso de *E. coli*, a legislação brasileira estabelece padrões microbiológicos através dos métodos tradicionais.

4. Discussão

Os peixes podem albergar diversos microrganismos, inclusive alguns patogênicos, fazendo-se necessário a identificação para que não comprometa a qualidade do produto e a saúde do consumidor.

Em duas amostras (16,66%) de cachara e em uma (12,5%) de pacu, o resultado para *Salmonella spp* foi positivo, estando em desacordo com a legislação vigente, que é preconizado pela Resolução RDC 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, a ausência desta bactéria em 25 gramas do pescado *in natura* ou refrigerado (ANVISA, 2001). Resultados semelhantes aos dessa pesquisa foram encontrados por Bartolomeu et al., (2011), que detectaram a presença de *Salmonella spp.* em 4 amostras de filés de tilápia em uma indústria de processamento de pescados; e Santos et al., (2008), que também obtiveram amostras positivas em filés de piramutaba, comercializados em supermercados, indicando que a amostra estava imprópria para o consumo humano.

Já para o híbrido Tambatinga, não foi detectado a presença de *salmonella spp* em nenhuma das amostras. Martins et al., (2002) pesquisaram *Salmonella spp* em pescados comercializados em “pesque-pague” no Paraná, e os resultados encontrados corroboram com o obtido na presente pesquisa, ou seja, nenhuma amostra foi positiva para esse gênero.

As bactérias do gênero *Salmonella spp.* não fazem parte da microbiota do pescado, e quando presentes, indicam que houve falha durante a manipulação do peixe ou contaminação do mesmo pela água, uma vez que elas são amplamente distribuídas na natureza, sendo o trato intestinal do homem e dos animais o principal reservatório natural (CARDOSO et al., 2006). De acordo com Onyango et al., (2009), para prevenir a ocorrência de bactérias entéricas advindas da aquicultura, deve-se seguir os procedimentos de higiene durante toda a cadeia de processamento do pescado.

Através da técnica molecular empregada, o resultado obtido para *Staphylococcus aureus* foi satisfatório, estando ausente em todas as amostras estudadas. Tal resultado também foi encontrado por Soares et al., (2012), que não detectaram a presença de *S. aureus* em filés de tilápia conservados em gelo e comercializados no município de Apodi, Rio Grande do Norte. Lorenzon (2009), em seu estudo sobre perfil microbiológico de peixes e água de cultivo em pesque-

pagues de São Paulo, constatou a ausência de *Staphylococcus aureus* através do teste de coagulase utilizando plasma de coelho, pelo fato dos peixes terem sido coletados diretamente dos viveiros e não receberem nenhum tipo de manipulação.

Essa bactéria geralmente é encontrada no corpo humano (trato respiratório, mucosas nasais e pele), sendo transferida ao alimento por pessoas portadoras com precários hábitos de higiene durante o manuseio e/ou armazenamento do produto (LORENZON, 2009). A proporção de portadores humanos pode atingir 60% dos indivíduos saudáveis, havendo uma média de 25 a 30% da população que é portadora de estirpes produtoras de enterotoxinas, sendo o maior causador de intoxicações alimentares o *S. aureus*, que exerce a sua ação através de suas toxinas, que se formam por ocasião do seu crescimento (FRAZIER et al., 1993; AHMED, 1991).

A qualidade dos alimentos, no quesito microbiológico, é obtida pela ausência de bactérias de origem fecal (*E. coli* e coliformes termotolerantes). Do total de 12 amostras de cachara e 8 de pacu estudadas, foi detectada contaminação por *E. coli* em 6 amostras (50%) de cacharas e em 3 (37,5%) de pacu e não foi encontrada a presença em nenhuma amostra de tambatinga. Bartolomeu et al., (2011) observou que houve contaminação na água de recepção e lavagem de tilápias em uma indústria de processamento, constatando que estava em desacordo com a Portaria nº 185/1997 (BRASIL, 2004), que estabelece a ausência de coliformes totais e *E. coli* a cada 100 mL de água.

Muratori et al., (2004) ao analisar branquinhas (*Curimatus ciliatus*), peixe de água doce encontrado em Teresina (PI), encontrou 14 amostras num universo de 34, contaminados por *E. coli*, e Mello et al., (2010), em estudo sobre a qualidade microbiológica de piraputangas (*Brycon microlepis*) de cativeiro e do rio Cuiabá, MT, constataram a ocorrência de *E. coli* em 11,11% das amostras de peixes de rio e em 33,3% nas amostras provenientes de cativeiro. Almeida Filho et al., (2002) estudando amostras de peixes oriundos do Pantanal mato-grossense e comercializados em supermercados e feiras livres em Cuiabá, encontraram contaminação por coliformes totais em 90,9% das amostras de ambos os locais.

Segundo Franco et al., (2008), o uso de *E. coli* como indicador de contaminação de origem fecal em água, vem sendo utilizado desde 1892, devido esse microrganismo ser encontrado no conteúdo intestinal do homem e de animais de sangue quente. De acordo com Muratori et al., (2004), a microbiota de peixes

recém capturados reflete o ambiente terrestre próximo aos ambientes hídricos e as condições microbiológicas do local de captura. Vieira et al. (2000), afirmam que toda a forma de contaminação ambiental acaba por retornar ao homem também de forma agressiva, neste caso, pela ingestão de peixes de baixa qualidade higiênico-sanitária, que podem ser nocivos à saúde do consumidor.

Em peixes oriundos de rios, a contaminação está associada ao crescimento de indústrias agrícolas. A contaminação excessiva do rio Cuiabá tem sido ocasionada pelo intenso crescimento desse tipo de indústria, que elimina seus resíduos no rio, elevando assim, a sua carga microbiana, ocasionando doenças à população e reduzindo o estoque de pescados (PIAIA, 1999).

Uma alternativa viável para amenizar a carência do estoque pesqueiro recorrente desse tipo de degradação dos rios é a piscicultura. Em alguns tipos de produção, os piscicultores estão associando a criação de peixes com criações de aves e suínos, utilizando os dejetos desses animais como alimentos para os peixes, reduzindo o problema de poluição ambiental (LIUSON, 2003). Porém a presença de outros animais pode ocasionar a contaminação da água e dos pescados, com enterobactérias, coliformes e outros agentes patogênicos de origem intestinal, como *Salmonella spp* e *E. coli* (MURATORI, 1994). Este mesmo autor, em 2001, relatou a mortalidade de tilápias criadas em viveiros com dejetos de suínos, sendo o agente causal a *Edwardsiella tarda*, mostrando assim que esta prática traz prejuízos aos peixes e também para o homem.

Segundo Surendraraj et al., (2009), a detecção de grupos de bactérias em pescados, sugere que devem ser seguidos rigorosos procedimentos de higiene durante a manipulação e o processamento de peixes provenientes da aquicultura, antes do consumo, a fim de evitar a transferência de bactérias potencialmente patogênicas aos consumidores.

A bactéria do gênero *Shigella* tem sido identificada como um dos principais agentes causadores de diarreia pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005). Sua transmissão ocorre pela água contaminada, alimentos crus e pelo contato de pessoas infectadas (NAVIA et al., 2005; WHO, 2005). As *Shigellas* alcançam os alimentos através da contaminação com matéria fecal humana, seja através da água, seja através das mãos dos manipuladores. A presença do agente em vários tipos de alimentos está diretamente relacionada com o papel desempenhado pelo

próprio homem como disseminador da bactéria, principalmente quando as condições de higiene pessoal são limitadas (ARIZA, 2010).

Na presente pesquisa, os resultados para *Shigella ssp* foram negativos para todas as amostras nas três espécies de peixes, indicando que esta bactéria não esteve presente ao longo da cadeia de produção e/ou manipulação dos espécimes investigados. Segundo Huss (1997), uma boa higiene pessoal e uma educação sanitária dos manipuladores de alimentos, são essenciais no controle de doenças causadas por *Enterobactérias*. A água deve ser tratada adequadamente e a eliminação sanitária dos esgotos também constituem, igualmente, aspectos essenciais para esse controle. Outra medida que se deve tomar para diminuir o risco de infecção por *Shigella* é fazendo a cozedura adequada do alimento antes do consumo.

5. Considerações finais

A técnica se mostrou viável, pois atendeu ao objetivo do trabalho que foi de avaliar as condições higiênico-sanitárias do pescado através de ferramenta da biologia molecular (PCR). O método foi considerado eficiente, pois além de reduzir o volume das amostras utilizadas, é altamente sensível, específico e preciso na detecção de patógenos, além da rapidez que se obtém resultados confiáveis. Esse método também pode ser utilizado para avaliar a qualidade microbiológica de diversos tipos de alimentos.

6. Referências

Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Brasil. Resolução nº 12, de 02 jan 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Brasília: **Diário Oficial da União**, 2001.

AHMED, F.E. **Seafood safety**. Washington D.C., USA. National Academy Press, 1991.

ALMEIDA FILHO, E. S. et al. Características microbiológicas de pintado (*Pseudoplatystoma fasciatum*) comercializado em supermercados e feiras livres no município de Cuiabá, MT. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 99, p. 8488, 2002.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 2001. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: APHA. 676p.

ARIZA, A.T.O. **Estufas: para que servem?**. 2010. Monografia (Especialização em Qualidade de Alimentos) - Universidade Castelo Branco, Campinas – SP, 2010.

Bartolomeu, D.A.F.S.; Dallabona, B.R.; Macedo, R.E.F.; Kirschnik, P.G. Contaminação microbiológica durante as etapas de processamento de filé de tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Archives of Veterinary Science**, v. 16, n. 1, p. 21-30, 2011.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Plano de Desenvolvimento da Aquicultura Brasileira – 2015/2020**. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/files/docs/Outros/2015/Plano_de_Developmento_da_Aquicultura-2015-2020.pdf>. Acesso em: 20 de Fev. 2016.

BRASIL. Ministério de Estado da Saúde. Portaria no. 518, de 25 de março de 2004. **Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências**. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 26 de março de 2004.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura**. Disponível em: <https://issuu.com/revistas_nd/docs/anu__rio_pesca_e_aquicultura_2014_i>. Acesso em: 20 de Fev.2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. 2011. In: Instituto Matogrossense de Economia Agropecuária – IMEA. Diagnóstico da Piscicultura em Mato Grosso. Outubro 2014. Disponível em: <P221_Diagnostico_da_Piscicult_ura_Versao_Final_com_capa>. Acesso em: 20 de Fev. 2016.

BLUMER, C.; KLEEFELD, A.; LEHNEN, D.; HEINTZ, M.; DOBRINDT, U.; NAGY, G.;MICHAELIS, K.; EMÖDY, L.; POLEN, T.; RACHEL, R.; WENDISCH, V.F.; UNDEN, G. Regulation of type 1 fimbriae synthesis and biofilm formation by the

transcriptional regulator LrhA of *Escherichia coli*. **Society for General Microbiology**, v. 151, n. 10, p.3287-3298, 2005.

CARDOSO, T. G.; CARVALHO, V. M. Toxifecção alimentar por *Salmonella* spp. **Rev. Inst. Ciênc. Saúde**. v. 24, n. 2, p. 95 – 101, 2006.

COSTA, A. B.; **Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica Belém**. 2003. 54p. Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba-SP, 2003.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. **Microbiologia de los alimentos**. 4. ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 681p.

FRANCO, B. G. M. B.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

GANDRA, E, A.; FERNANDEZ, M.A.; SILVA, J.A.; SILVA, W.P. Standardization of a multiplex PCR for the identification of coagulase-positive *Staphylococcus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 31, n. 4, p. 946-949, 2006.

HUSS, H.H. **Garantia da qualidade dos produtos da pesca**. FAO documento técnico sobre as pescas, n. 334. Roma, FAO. 1997. 176p.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. 2014. Disponível em: <http://sistemafamato.org.br/portal/famato/noticia_completa.php?codNoticia=235661>. Acesso em: 20 de Fev. 2016.

Janda, J.M; Abbott, S.L. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, 2007. Vol. 45 n°: 09. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01228-07>>. Acesso em: Set. 2015.

KUBITZA, F. "**O mar está prá peixe... prá peixe cultivado**". Panorama da Aqüicultura. Botafogo, v. 17, n. 100, p.14-23, 2007.

LIUSON. E. **Pesquisa de coliformes totais, fecais e *Salmonella* spp em tilapias de pesqueiros da região metropolitana de São Paulo**. 2003. 93 p. Dissertação (mestrado em epidemiologia experimental e aplicada as zoonoses). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 2003.

LORENZON, C. S. **Perfil microbiológico de peixes e água de cultivo em pesque-pagues situados na região Nordeste do estado de São Paulo**. 2009. 52 p. Dissertação (mestrado em aquicultura) - Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, São Paulo, 2009.

MARTINS, C.V.B.; VAZ, S.K.; MINOZZO, M.G. Aspectos sanitários de pescados comercializados em “pesque-pagues” de Toledo (PR). **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 98, p. 51-56, 2002.

MELLO, C. A. et al. Qualidade microbiológica do *Brycon microlepis* (piraputanga) de cativeiro e capturado no rio Cuiabá-MT, **Revista brasileira de Ciência Veterinária**, v.17, 2010.

Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/files/docs/Boletim_MPA_2011_pub.pdf>. Acesso em: 15 de mar. 2016.

Ministério da Pesca e Aquicultura. **Plano Safra – pesca e aquicultura 2015/2016**. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/files/docs/Planos_e_Políticas/plano_safra/Livro_do_Plano_Safra.pdf>. Acesso em: 15 de mar. 2016.

MURATORI, M.C.S; PEREIRA, M. M. G; SOARES, L. R. Pesquisa de bactérias potencialmente patogênicas em pescado comercializado no mercado central de Teresina (PI). **Bol. Centro Pesqui. Process. Aliment.** V.12, n. 1, p. 33-38, 1994.

MURATORI, M.C.S; MARTINS, N. E; PEIXOTO, M. T. D. Mortalidade por “septicemia dos peixes tropicais” em tilápias criadas em consorciação com suínos. **Arq. Bras. Med.Vet. Zootec.** V. 53, n. 6, p. 658-662, 2001.

MURATORI, M.C.S; COSTA, A.P.R.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, P.C.; PODESTÁ Jr., R.L. Qualidade sanitária de pescado “*in natura*”. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 116/117, p. 50-54, 2004

Navia, M.M.; Gascón. V.J. Genetic diversity of *Shigella* species from different intercontinental sources. **Infect. Genet. Evol.** v. 5, p.349–353, 2005.

OLIVEIRA, R.D. de; NOGUEIRA, F.M. de B. Characterization of the fishes and of subsistence fishing in the Pantanal of Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Biologia.** v. 60, n. 3, p. 435-445, 2000.

ONYANGO, D.M.; WANDILI, S.; KAKAI, R. et al. Isolation of *Salmonella* and *Shigella* from fish harvested from the Winam Gulf of Lake Victoria, Kenya. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 3, n. 2, p.99-104, 2009.

ORDÓÑEZ. J. A; et. al. **Tecnologia de alimentos**. 2 ed. Porto alegre: Artmed, 2005. 279 p.

PIAIA, I. I. **Geografia de Mato Grosso**. 2 ed. Cuiabá: UNIC, 1999. 207 p.

PINHEIRO, A. et al.; **1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura**. Disponível em: < http://issuu.com/revistas_nd/docs/anu__rio_pesca_e_aquicultura_2014_i>. Acesso em: 14 mar. 2015.

SANTOS, T. M.; MARTINS R. T.; SANTOS W. L. M; MARTINS, N. E. Inspeção visual e avaliações bacteriológica e físico-química da carne de piramutaba (*Brachyplatistoma vaillanti*) congelada. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 60, n. 6, p. 1538-45, 2008.

SILVEIRA, E. L. DA. **Identificação de comunidades bacterianas de solo por sequenciamento do gene 16S rDNA**. 2004. 83 p. Dissertação (mestrado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de ciências agrárias e veterinárias. Jaboticabal, 2004.

SOARES, K. M. P. S.; GONÇALVES, A. A.; SOUZA, L. B.; SILVA, J. B. A. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) armazenadas em gelo. **Acta veterinária Brasilica**. v. 6, n. 3, p. 239-242, 2012.

SONG T, TOMA C, NAKASONE N, IWANAGA M. Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method. **FEMS Microbiology Letters**, n. 243, p. 259–263, 2005.

Surendraraj, A., K.H.S. Farvin, R. Yathavamoorthi and N. Thampuran. Enteric bacteria associated with farmed freshwater fish and its culture environment in kerala, India. **Res. J. Microbiol**, n. 4, p. 334-344, 2009.

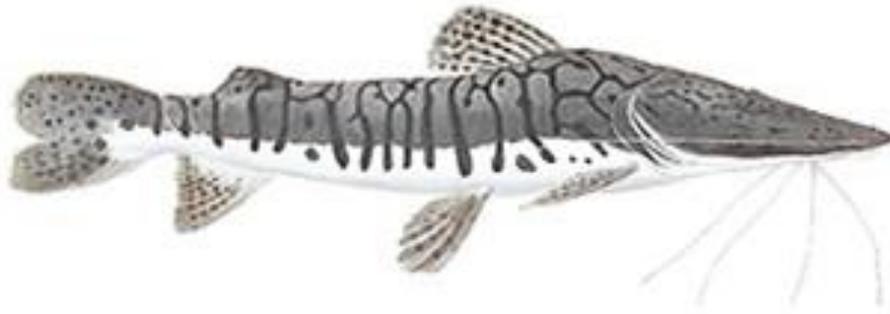
SUH, K. D.; SONG, C. J. Prevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* in swine herds. **Journal Veterinary Science**, v.6, p.289-293, 2005.

VIEIRA, K. V. M.; MAIA, D.C.C.; JANEIRO, D. I.; VIEIRA, R.H.F; CEBALLOS, B.S.O. Influencia das condições higiênico-sanitárias no processo de beneficiamento de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em filés congelados. **Hig. Aliment.** V. 14, n. 74, p. 37-40, jun. 2000.

World Health Organization (WHO) (2005). **Guidelines for the control of Shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* type 1**. Disponível em: <http://www.who.int/vaccine_research/documents/Guidelines_Shigellosis.pdf>. Acesso em Set. 2015.

7. Anexos

Figura 1: Cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*).



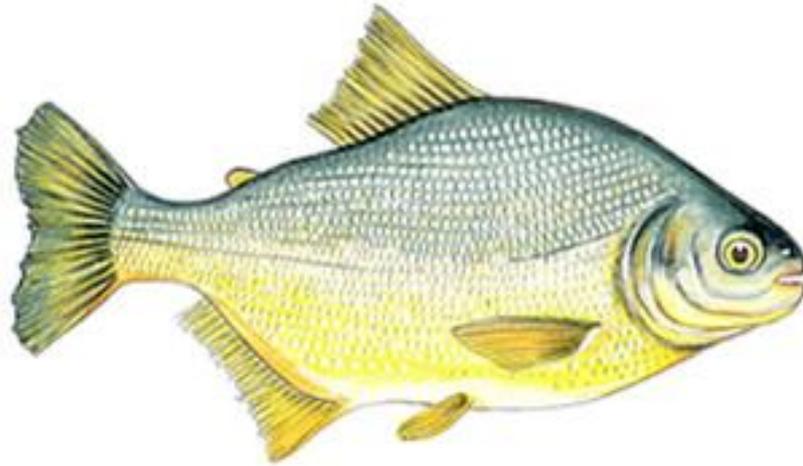
Fonte: Clube da pescaria. Disponível em:
<<http://www.clubedapescaria.com.br/peixe/cachara>>. Acesso em: 13 de mar. 2016.

Figura 2: Tambatinga (*C. macropomum* x *P. brachypomus*).



Fonte: Clube da pescaria. Disponível em:
<<http://www.clubedapescaria.com.br/peixe/tambatinga>>. Acesso em: 13 de mar. 2016.

Figura 3: Pacu (*Piaractus mesopotamicus*).



Fonte: Clube da pescaria. Disponível em:
<<http://www.clubedapescaria.com.br/peixe/pacu-caranha>>. Acesso em: 13 de mar.
2016.