



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATO
GROSSO
CAMPUS CUIABÁ - BELA VISTA
DEPARTAMENTO DE ENSINO**

JAKELINE VILHALVA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE PESCADO DA BAIXADA CUIABANA
ATRAVÉS DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE.**

**Cuiabá
2016**

ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JAKELINE VILHALVA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE PESCADO DA BAIXADA CUIABANA
ATRAVÉS DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Campus Cuiabá - Bela Vista para obtenção de título de graduado.

Orientador: Prof^a Dr^a Sandra Mariotto

**Cuiabá
2016**

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

S729a

Souza, Jakeline Vilhalva de.

Avaliação microbiológica de pescado da baixada cuiabana através da técnica de reação em cadeia de Polimerase. / Jakeline Vilhalva de Souza._ Cuiabá, 2016.

28 f.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sandra Mariotto

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

1. Contaminação – TCC. 2. DNA – TCC. 3. Bactérias – TCC. I. Mariotto, Sandra. II. Título.

IFMT CAMPUS CUIABÁ BELA VISTA CDU 579.67:597
CDD 664.94

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE PESCADO DA BAIXADA CUIABANA
ATRAVÉS DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE.**

Trabalho de Conclusão de Curso 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.

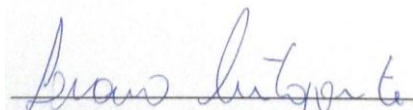
Aprovado em: 02/08/2016



Prof^a. Dr^a. Sandra Mariotto (Orientador)



Prof^a. Dr^a. Selma Baia Batista (Membro da Banca)



Prof^o. Dr^o. Liano Centofante (Membro da Banca)

**Cuiabá
2016**

Dedicatória

Dedico em primeiro lugar ao meu Deus, pela vida, por toda força, por sempre guiar e abençoar os meus caminhos. Aos meus pais, José Aparecido de Souza e Teodora Vilhalva Belasque, por toda dedicação a minha formação, paciência e amor. Por muitas vezes terem abdicado de seus sonhos, para que o meu fosse realizado. A minha irmã, Eduarda Vilhalva de Souza, por todo amor e carinho. Muito obrigada, por tudo. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade que me foi concedida de concluir o ensino superior, com saúde, paz, e da melhor forma possível. Por sempre ter me guiado e estado ao meu lado. Pelas pessoas maravilhosas que ele tem colocado em minha jornada.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, a todos os professores do curso de Engenharia de Alimentos, pelos ensinamentos e que contribuíram para o meu crescimento acadêmico.

À orientadora, Professora Dr^a Sandra Mariotto por toda paciência, instrução e dedicação para que meu aprendizado fosse possível e o trabalho concluído.

Aos Professores Doutores Liano Centofante, Paulo César Venere e Daniela Ferreira, do Instituto de Biociências, da Universidade Federal de Mato Grosso, pela atenção e cooperação durante a realização do projeto. A todos do laboratório de genética animal da UFMT, e a própria UFMT pela estrutura oferecida.

À professora Dr^a Selma Baia Batista pela cooperação, paciência e instruções nas fases iniciais deste trabalho.

Agradeço também as colegas de pesquisa Érika Cerqueira e a Mestra Débora Cristina Pastro, que sempre contribuíram comigo e com o andamento do trabalho.

Agradeço aos meus pais, José Aparecido de Souza e Teodora Vilhalva Belasque, por todo amor e apoio. Por serem sempre os primeiros a acreditarem em meus sonhos, nunca duvidando que conseguirei a vitória.

Aos meus familiares, pelo apoio.

Muito Obrigada a todos, que fizeram parte desse momento da minha vida e que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização dessa etapa.

Sumário

1. Introdução.....	11
2. Material e Métodos.....	14
2.1 Coleta das Espécies	14
2.2 Cultivo de Bactérias	15
2.3 Extração de DNA Bacteriano	15
2.4 Corrida Eletroforética.....	16
2.5 Quantificação de DNA.....	16
2.6 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	16
2.7 Corrida Eletroforética em Gel de Agarose	17
3. Resultados e Discussão.....	18
4. Conclusão.....	23
5. Referências	24



INSTITUTO FEDERAL DE
EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
Mato Grosso
Campus Cuiabá - Bela Vista

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE PESCADO DA BAIXADA CUIABANA ATRAVÉS DA TÉCNICA MOLECULAR DE REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE

SOUZA, Jakeline Vilhalva¹

PASTRO, Débora²

MARIOTTO, Sandra³

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo a avaliação microbiológica dos pescados comercializados em Cuiabá, Mato Grosso. Verificou-se a presença de *Salmonella* spp, *Staphilococcus aureus* e *Escherichia coli*. A pesquisa qualitativa, foi desenvolvida utilizando-se da técnica molecular de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), a qual é considerada mais rápida e sensível comparada aos métodos tradicionais de análise. Das 19 amostras coletadas de peixes (tambacú e pintado), 9 (47,37%) continham microrganismos indicadores, patógenos e/ou potencialmente patogênicos. A quantidade de amostras positivas obtidas para *Escherichia coli* foram 5/ 19 (26,31%), *Staphylococcus aureus* 3/19 (15,79%) e *Salmonella* spp 1/19 (5,26%). A PCR foi considerada satisfatória na análise de alimentos, detectando a presença dos microrganismos de interesse estudados, utilizando-se de um par de *primers* específico para cada bactéria analisada no pescado.

Palavras-chave: Contaminação, DNA, bactéria.

¹Graduanda em Engenharia de Alimentos; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, Campus Cuiabá – Bela Vista; jakelinevs8@gmail.com

²Mestra 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

Study aimed to microbiological evaluation of fish marketed in Cuiabá, Mato Grosso. The presence of *Salmonella spp* was verified, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Qualitative research, was developed using the molecular technique of Polymerase Chain Reaction (PCR), which was considered faster and more sensitive compared to traditional methods of analysis. Of the 19 samples collected from fish (tambacu and pintado), 9 (47.37%) contained indicator organisms, pathogens and / or potentially pathogenic. The amount of positive samples were obtained for *Escherichia coli* 5/19 (26.31%), *Staphylococcus aureus* 3/19 (15.79%) and *Salmonella* 1/19 (5.26%). The PCR considered satisfactory in food analysis, detecting the presence of microorganisms of interest studied, using a pair of *primers* specific for each bacterium analyzed in fish.

Keywords: Contamination, DNA, bacteria.

1. Introdução

O pescado pode ser obtido de duas maneiras: A pesca convencional e a aquicultura. Sendo a pesca uma atividade extrativista, retirando o pescado de seu ambiente natural, podendo ser classificado em três tipos: artesanal, amadora e natural. Já na aquicultura ocorre o cultivo de organismos aquáticos, podendo ser classificado em dois tipos: Continental (água doce) e marinha (água salgada).

O pescado é um alimento que se destaca nutricionalmente quanto à quantidade e qualidade das suas proteínas, à presença de vitaminas e minerais e, principalmente, por ser fonte de ácidos graxos essenciais ômega-3 (SARTORI et al., 2012).

Muitos são os trabalhos que sugerem e evidenciam a importância da ingestão de ácidos graxos poli-insaturados como o ômega-3 na dieta, pois relatam que podem prevenir doenças na saúde humana e causar impactos positivos em doenças como o câncer, doença cardiovascular e melhora no desenvolvimento infantil (CARMO et al., 2009; LIMA et al., 2004; LOTTENBERG, 2009; GUINÉ et al., 2011; SUÁREZ-MAHECHA et al., 2002; CASANOVA et al., 2011).

O peixe constitui fonte de proteínas de alto valor biológico, tão importante quanto a carne bovina. Em muitos países, principalmente da Europa e Ásia, é a proteína de origem animal mais consumida. O teor proteico das diferentes espécies de peixe varia de 15% a 20% (GERMANO et al., 2001).

Nos últimos dez anos, o consumo de pescado mais que dobrou no Brasil. Só de 2012 para 2013, o consumo no país cresceu quase 25% ultrapassando o mínimo estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que é de 12 Kg/habitante/ano. Em 2014, a população consumiu em média 14,5 quilos de pescado por habitante/ano (MPA - MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2014).

Mato Grosso tem destaque nacional como produtor agrícola e também na pecuária, tendo potencial para inserção de novas produções como a piscicultura. A piscicultura é um ramo da aquicultura, atribuído à criação de peixes em ambiente propício ao seu desenvolvimento.

Segundo Souza (2003), sendo o animal criado em ambientes fechados, com possibilidades de padronização, controle e programação da produção, manejo sanitário eficiente antes, durante e após a captura e com condições ambientais controladas, o produto para o consumo apresentará melhor qualidade.

Atualmente, dentre os grupos de peixes mais cultivados no Estado, destacam-se os peixes redondos formados pelas espécies nativas pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) e seus híbridos tambacu e tambatinga, bagres de couro pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e os brycons piraputanga (*Brycon microlepis*) e matrinxã (*Brycon cephalus*) (FAMATO, 2014).

Apesar de todas as qualidades e grande potencial de crescimento no mercado, o pescado é um dos alimentos mais susceptíveis a deterioração devido à atividade de água elevada, composição química, teor de gorduras insaturadas facilmente oxidáveis e, principalmente, ao pH próximo da neutralidade (FRANCO et al., 2008).

De acordo com o Ministério da Saúde (2010) as Doenças Transmitidas por alimentos têm aumentado mundialmente e vários são os fatores para que isso ocorra como: o crescente aumento das populações; a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos; o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande escala. Essas doenças são causadas por agentes, os quais penetram no organismo humano através da ingestão de água ou alimentos contaminados (AMSON et al., 2006).

As bactérias patogênicas podem ter acesso ao pescado, por manipulação inadequada do alimento, ausência de higiene por parte dos manipuladores, processamento e armazenamento inadequado, qualidade da água entre outros meios, podendo ocasionar doenças ao consumidor, devido a essas bactérias patogênicas e/ou suas toxinas.

As bactérias analisadas nesse trabalho foram *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp* e *Staphylococcus aureus*, as quais possuem características próprias, porém todas são patogênicas.

São feitas análises microbiológicas para verificar se a qualidade do pescado está de acordo com o que é preconizado pela legislação como a RDC nº 12, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001). Os testes feitos por técnicas tradicionais de microbiologia de alimentos fundamentam-se na utilização de testes morfológicos e bioquímicos para tipagem, subtipagem e identificação de gêneros, espécies e subespécies microbianas (GANDRA et al., 2008).

Segundo Huss (1997), os testes microbiológicos são caros, morosos e exigem muita mão de obra. Esses testes exigem um tempo prolongado de análise, obtendo

resultados somente depois de vários dias, e também apresentam dificuldades quanto a amostragem, métodos analíticos e o uso de organismos indicadores.

As técnicas microbiológicas mais comumente utilizadas são realizadas em meios de cultura não-seletivos e seletivos complementados por testes bioquímicos diferenciais, na sua maioria, de produção enzimática, usados em conjunto com testes sorológicos (GANDRA et al., 2008).

Nas últimas décadas, verificou-se aumento significativo no desenvolvimento de técnicas moleculares para a detecção, identificação e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos (GANDRA et al., 2008). Avanços, nos estudos de biologia molecular, propiciaram o desenvolvimento e emprego de vários métodos de tipagem molecular (DESTRO, 1995).

Uma das técnicas moleculares utilizadas na detecção de bactérias patogênicas é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), desenvolvida nos anos 80 por Kary Mullis. A descoberta da (PCR) trouxe enormes benefícios e desenvolvimentos científicos como o sequenciamento de genomas, a expressão de genes em sistemas recombinantes, o estudo da genética molecular, a determinação rápida da paternidade e o diagnóstico rápido de doenças infecciosas (NOVAIS et al., 2004).

De acordo com Tortora et al. (2012), a Reação em Cadeia de Polimerase é uma técnica em que pequenas amostras de DNA podem ser rapidamente amplificadas, isto é, aumentadas em quantidades suficientes para que a análise seja feita.

A utilização da metodologia da PCR foi a escolha de muitos autores (PREZZI et al., 2010; DICKEL et al., 2005; FLÔRES et al., 2003; SOARES et al., 2005; GOUVÊA et al., 2012; OLIVEIRA, 2012) na detecção de microrganismos patogênicos em alimentos, identificação de doenças entre outros, obtendo resultados satisfatórios, visto que é considerada uma técnica mais rápida que as convencionais.

Este trabalho teve por objetivo a determinação de bactérias patogênicas em pescado da baixada cuiabana com a utilização de ferramenta molecular (PCR).

2. Material e Métodos

2.1 Coleta das Espécies

Foram analisadas duas espécies sendo uma nativa *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) e a outra de cativeiro, o híbrido tambacu conforme mostram as figuras 1 e 2 respectivamente, coletados em duas feiras livres, localizadas em Cuiabá-MT.



Figura 1: *Pseudoplatystoma corruscans*.



Figura 2: Tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*).

Foram adquiridas amostras retiradas do músculo do peixe, sendo 12 amostras de pintado e 7 amostras do peixe híbrido, de aproximadamente 25g, coletadas fazendo-se uso de luvas e com a utilização de pinças e tesouras estéreis. As amostras foram acondicionadas em embalagens plásticas para alimentos e transportadas dentro de uma caixa de isopor, com gelo.

Em seguida, levado para o laboratório, onde foram realizados os primeiros procedimentos. Todos os procedimentos de genética molecular foram realizados no laboratório de genética animal, Instituto de Biociências, da Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT.

2.2 Cultivo de Bactérias

O cultivo foi realizado de acordo com o protocolo do Método da American Public Health Association (APHA, 2001).

No laboratório, foi pesado 25g do tecido do peixe e colocado em 225 mL de água peptonada a 0,1% estéril, homogeneizado e deixado em repouso por 10 minutos. Posteriormente, o cultivo foi realizado em caldo BHI (caldo infusão cérebro e coração), colocando em micro tubos de 1,5 mL, 100 µL da solução de água peptonada em 150 µL de caldo BHI e deixando em estufa a 35°C +- 2°C por 18 horas para o crescimento das bactérias. Posteriormente, os tubos foram retirados da estufa e feito a extração de DNA bacteriano.

2.3 Extração de DNA Bacteriano

A extração foi realizada utilizando o kit RTP® Bactéria DNA Mini Kit (Stratec Molecular), seguindo seu protocolo. Primeiramente, retirou-se 0,1mL (100µL) do cultivo feito em caldo BHI transferindo para o tubo de extração, adicionou-se 400µL do tampão de ressuspensão incubando por 10 minutos a 37°C em banho-maria. Logo depois, foi incubado por mais 10 minutos em banho-maria a 65°C e por último incubado de 5-10 minutos a 95°C. Em seguida, acrescentou-se 400µL do tampão de ligação (*binding buffer B6*), levando para o vórtex, para ocorrer a mistura. A amostra foi transferida para o filtro de rotação, incubada por 1 minuto e centrifugada por 2 minutos a 8000 rpm. Posteriormente, acrescentou-se 500 µL do tampão de lavagem 1 (*wash buffer 1*) no filtro do tubo, foi centrifugado por 1 minuto a 8000 rpm, descartando o filtrado. O filtro foi transferido para outro tubo e acrescentou-se 600 µL de tampão de lavagem 2 (*wash buffer 2*), sendo centrifugado por 1 minuto a 8000 rpm, descartando o líquido. Foi Centrifugado novamente por 4 minutos a 1100 rpm para retirada de possíveis resíduos de etanol.

Por fim, foi descartado o tubo RTA receptor (*RTA receiver*) colocando o filtro em um novo tubo de 1,5 mL e aliquoteado 150 µL de tampão de eluição, incubando por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugando por 1 minuto a 11000 rpm,

para ressuspender o DNA. Em seguida, foi descartado o filtro sendo o DNA armazenado a -20°C imediatamente.

2.4 Corrida Eletroforética

Posteriormente, foi feita a corrida do gel de eletroforese numa concentração de 1%, sendo 0,3 g de agarose e 30 mL de TBE (Tris/Borate/EDTA), em um tempo de 30 minutos, utilizando-se os corantes red e blue e o marcador molecular ladder (100 pares de base) para detecção de DNA presente. Com a visualização do gel e confirmação de presença de DNA, a quantificação de DNA era realizada.

2.5 Quantificação de DNA

O DNA extraído foi quantificado com o DS-11 nanoespectrofotometro e em seguida feita a PCR.

2.6 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Para pôr em prática a PCR, foi utilizado um par de *primer* específico para cada tipo de bactéria: *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* e *Staphilococcus aureus*, de acordo com quadro 1.

Quadro 1- Informações dos iniciadores.

BACTÉRIA	DESENHO DO PRIMER	AMPLIFICAÇÃO	GENE	Tm °C	FONTE
<i>S. aureus</i>	NUC 1: ATGAAGTCAAATAAATCGCT NUC 2: TTTGGTGAAAATACTTCTC	458 pb	nuc	F:50° R:49°	GANDRA, 2006
<i>Salmonella ssp.</i>	SAF: TTGGTGTTTATGGGGTCGTT SAR: GGGCATACCATCCAGA GAAA	298 pb	invA	F: 57,34° R:56,97°	SUH e SONG, 2005
<i>E. coli</i>	GapA for: GTT GTC GCT GAA GCA ACT GG GapA rev: AGC GTT GGA AAC GAT GTC CT	171 pb	GapA	F:60° R:59°	BLUMER, 2005
<i>Shigella flexneri</i>	Ipa III for: GTTCTTGACCGCCTTTCCG ATACCGTC Ipa IV ver: GCCGGTCAGCCACCCTCTGA GAGTAC	620 pb	ipaH	F:68.68 R: 69.95	SONG, 2005

Para cada par de *primer* foi feita uma reação, sendo um mix preparado com volume final de 25 μL . Esse volume final foi composto de 2,5 μL de tampão 10X, 1,5 μL de MgCl_2 , 0,5 μL de DNTP (10mM), 1 μL de cada *primer* (10uM), 0,2 μL de Taq DNA polimerase e 1 μL de DNA purificado, sendo o volume completado com água ultrapura.

O ciclo de amplificação utilizado foi desnaturação inicial a 95° C por 5 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 segundos, anelamento a 50°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Após os 30 ciclos de amplificação completados, teve o período de extensão final a 72°C por 7 minutos, sendo a reação interrompida automaticamente e a temperatura permaneceu em 12°C até a aplicação em gel de agarose para verificação dos resultados. O armazenamento das amostras ocorreu a -20°C.

2.7 Corrida Eletroforética em Gel de Agarose

Posteriormente, o resultado da Reação em Cadeia de Polimerase foi obtido por corrida eletroforética a 120v por um tempo de 40 minutos, em gel de agarose a 1,5% e visualização feita sob luz ultravioleta em transiluminador.

3. Resultados e Discussão

A tabela 1 apresenta os resultados da análise microbiológica em peixes feita por técnica de PCR em 19 amostras procedentes de duas feiras livres localizadas em Cuiabá – MT, sendo 12 amostras de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e 7 amostras do híbrido tambacu (macho *Piaractus mesopotamicus* x fêmea *Colossoma macropomum*) comercializados eviscerados. As amostras foram submetidas a amplificação com um par de *primers* específico para cada espécie de bactéria analisada sendo *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* e *Shigella flexneri*.

Tabela 1: Resultados da análise microbiológica por Reação em Cadeia de Polimerase.

Quantidade de Amostras	Peixes	Amostras Positivas			
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Shigella flexneri</i>
PINTADO					
12	(<i>P. corruscans</i>)	3	1	0	0
TAMBACÚ					
7	(<i>P. mesopotamicus</i> X <i>C. macropomum</i>)	2	2	1	0
Total	19	5	3	1	0

Dentre as 19 amostras analisadas 9 (47,37%) continham microrganismos indicadores, patógenos e/ou potencialmente patogênicos. A quantidade de amostras positivas obtidas para *E. coli* foram 5/ 19 (26,31%), *S. aureus* 3/19 (15,79%) e *Salmonella spp.* 1/19 (5,26%).

Os principais microrganismos presentes na água e em alimentos contaminados e responsáveis pelas numerosas doenças são *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* (Sousa, 2006).

Alguns microrganismos patogênicos como *Clostridium botulinum*, *Vibrio spp* (incluindo *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*) e *Listeria spp* podem ocorrer no ambiente natural onde o peixe e mariscos são capturados. Outros, como *Escherichia*

coli, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp* e *Shigella spp*, contaminam o pescado a partir de fontes humanas e animais (SANTOS et al., 1992).

A maior contaminação dos pescados analisados se deu pela bactéria *Escherichia coli*, com presença em 26,31% das amostras, conforme mostra a Figura 3.

A Figura 3 apresenta a eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos com o *primer* GapA, identificando a presença de *Escherichia coli*. Todas as amostras (1 e 2), incluindo o controle positivo, onde utilizou-se o DNA de uma cultura bacteriana pura e certificada de *E.coli*, chamada de cepa (4), tiveram a amplificação bem sucedida e não houve amplificação do controle negativo (3), o que demonstra que o experimento foi realizado de forma correta não havendo contaminação cruzada.

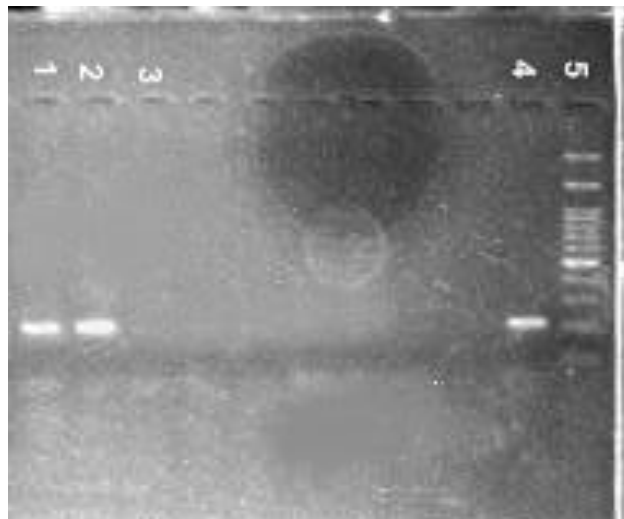


Figura 3 – Análise microbiológica através da técnica de PCR (*Escherichia coli*).

Essa bactéria faz parte da flora intestinal de animais de sangue quente, indicando quando presente no alimento contaminação microbiana de origem fecal e portanto estando em condições insatisfatórias para o consumo (Franco et al., 2008), pois indica que outros microrganismos patogênicos podem estar presentes no alimento, devido às más condições higiênicas.

SILVA et al. (2008) também encontrou *Escherichia coli* em sua pesquisa de análise microbiológica em pescado coletados em 5 feiras livres de São Paulo. Analisando 20 amostras de pescado, a *E.coli* foi isolada de 2 (10%) amostras analisadas. Muratori et al. (1994) analisou 30 amostras de *Curimatus ciliatus* (Branquinhas), peixe de água doce comercializadas no mercado central de Teresina,

Piauí, sendo que 20% (6 amostras) apresentaram *E.coli*. O isolamento de patógenos e/ou organismos indicadores é usado para avaliar a qualidade e inocuidade do alimento, permitindo o controle sanitário. Manipuladores de alimentos possuem um papel importante na disseminação de microrganismos, podendo o pescado ser contaminado devido aos maus hábitos de higiene (SILVA et al., 2008).

Lopes et al. (2012) destaca que o gelo também pode ser fonte de contaminação do alimento, devendo ser fabricado a partir da água potável e ser mantido em condições higiênico-sanitárias que evite sua contaminação.

Para *Salmonella spp* a detecção foi de 1/19 ou seja 5,26% das amostras, sendo encontrada no pescado de cativeiro tambacu (*Piaractus mesopotamicus x Colossoma macropomum*) e não detectado no pescado de vida livre pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). Baseando-se na legislação (Brasil, 2001) que estabelece que a carne de pescado in natura, resfriada ou congelada deve estar livre de *Salmonella spp* em 25g, essa amostra apresentou-se imprópria para o consumo. Normalmente a presença de *Salmonella spp*. nos alimentos está ligada à manipulação e/ou estocagem inadequadas dos mesmos (RITTER et al., 2012).

Oliveira (2015), em sua pesquisa com pescado também encontrou *Salmonella spp*. Das 6 amostras coletadas de pintado inteiro e eviscerado, comercializados em quatro hipermercados de Brasília, em 2014, 2 amostras, ou seja 33,34% estavam impróprias para o consumo, pois apresentaram cepas de *Salmonella* em 25g. Lanzarin et al. (2012) também fez análise de peixe tambacu (*Piaractus mesopotamicus X Colossoma macropomum*) eviscerado e sem espinha e um exemplar de tambacu eviscerado, descabeçado e cortado em banda, coletados no mercado municipal da cidade de Cuiabá, Mato Grosso em um total de 50 amostras. Em relação à pesquisa de *Salmonella spp*. 100% das amostras de tambacu analisadas foram negativas.

Segundo Trabulsi et al. (2008), quando há presença de *Salmonella* em ambientes, água potável e alimentos, deve-se a contaminação por fezes de indivíduos doentes ou portadores. Quando ocorre da água e os alimentos que foram contaminados serem consumidos por pessoas e outros animais, esses microrganismos são novamente excretados no material fecal, continuando o ciclo (JAY, 2005).

Dessa forma, a contaminação do pescado por bactérias sofre a influência de muitos fatores tais como a poluição da água, temperatura, método de captura, os métodos de conservação e práticas de manipulação (GHASEMI et al., 2010).

Staphylococcus aureus foi detectado em 3/19 ou seja, 15,79% das amostras analisadas neste trabalho. Rocha et al. (2013) analisou 15 amostras de filés de tilápia comercializados no Mercado Modelo Nerival Araújo em Currais Novos, Rio Grande do Norte, confirmando presença de *S. aureus* em 100% das amostras. Aquino et al. (1996) em seu estudo microbiológico com pescado sendo pirarucu (*Arapaima gigas*), tambaqui (*Colossoma macropomum*) e tucunaré (*Cichla ocellaris*) coletou 45 amostras adquiridas em diferentes pontos da cidade de Manaus (AM). As análises indicaram que 9 (20%) amostras estavam fora do padrão para *S. aureus*.

Essa bactéria é de origem humana, como consequência direta da manipulação inadequada (Germano, 2001), amplamente distribuída no meio ambiente, podendo ser encontrada frequentemente no ar, em fezes, esgotos, alimentos e, principalmente, na mucosa nasal do homem e de animais (CASTRO et al., 1984), e que encontram no pescado ambiente favorável para sua multiplicação (Germano, 2001).

De acordo com Franco et al. (2005), esta espécie é a que está associada frequentemente às doenças estafilocócicas, causando intoxicação provocada pela ingestão do alimento que apresenta a toxina pré-formada, ou seja, o agente causal não é a bactéria, mas as várias toxinas que essa bactéria produz. A toxina estafilocócica é termorresistente, não sendo facilmente destruída pelo calor (ASSIS, 2014).

Segundo Rocha et al. (2013) se a manipulação do produto e o recebimento de dinheiro forem realizados por uma mesma pessoa, sem a adequada higienização, pode ser uma das fontes de contaminação do alimento, visto que *S.aureus* e outros microrganismos podem ser veiculados através de cédulas de dinheiro (FERREIRA et al., 2012).

Por essa bactéria também ser encontrada na superfície da pele, e os manipuladores não utilizarem luvas, pode ser um fator de contribuição para detecção nas amostras. Como mostra a pesquisa de Muratori et al. (2007), baseada na detecção de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, analisando-se 128 amostras de água, onde manipuladores lavaram as mãos, em pisciculturas. Todas as propriedades os manipuladores apresentaram *Staphylococcus aureus* nas mãos.

Silva-Junior et al. (2015) destaca a questão da higienização de superfícies a serem realizadas com o uso de panos de limpeza confeccionados em algodão, lavados e secos nas próprias áreas de comercialização, podendo ser fonte de contaminação cruzada, caso não seja feita higienização e uso correto. Bartz (2008) detectou em sua pesquisa contaminações com *S. aureus* em panos de limpeza utilizados em serviços de alimentação, confirmando essa possibilidade.

Não foram encontrados trabalhos de análise microbiológica em peixe de água doce para a espécie de *Shigella flexneri*, impossibilitando comparações. Porém, nesta pesquisa não foi detectada a presença de *Shigella flexneri* nas 19 amostras de peixes analisadas.

A principal via de transmissão entre os seres humanos, é a fecal-oral, mas há casos de transmissão pela água e por alimentos (Assis, 2014). Infecta principalmente o homem e, excepcionalmente, outros primatas como macacos e chimpanzés, causando a shigelose ou disenteria bacilar (TRABULSI et al., 2008)

No Brasil, *Shigella flexneri* e *S. sonnei* são isoladas mais frequentemente, sendo consideradas um dos principais agentes de enterocolite, associada a higiene pessoal e condições sanitárias deficientes (Franco et al., 2005).

A ausência da espécie *Shigella flexneri* nas amostras, não significa que os manipuladores seguiram os procedimentos de Boas Práticas de Fabricação (BPF), visto que os *primers* para a espécie *Escherichia coli*, utilizada como indicador de origem fecal, amplificaram o DNA para essas amostras via PCR.

Segundo Forsythe (2013), a garantia da segurança precisa ser aplicada em toda cadeia alimentar. Para que isso seja atingido, é necessário a integração das ferramentas de gestão da segurança de alimentos. Das ferramentas disponíveis podemos citar as BPF (Boas Práticas de Fabricação), PPHO (Procedimentos Padrão de Higiene Operacional), MRA (Avaliação de Riscos Microbiológicos), Gerenciamento da Qualidade (Série ISO), TQM (Gerenciamento da Qualidade Total) e o Sistema APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) (FURTINI et al., 2006).

4. Conclusão

Com base neste estudo pode-se verificar que a qualidade microbiológica do pescado comercializado na baixada cuiabana, em Mato Grosso não está satisfatória, indicando, em alguns casos, deficiência de higiene ou uso de água contaminada. As amostras de pescados apresentaram a presença de três, das quatro, bactérias analisadas podendo o alimento ter sido contaminado por procedimentos inadequados na captura, armazenamento, manipulação e também pela água em que foi retirado ou em que foi manipulado. Porém, a contaminação poderia ser evitada se o uso das Boas Práticas de Fabricação (BPF) tivessem sido adotadas pelos manipuladores do pescado e através de ações de saneamento básico.

A presença de bactérias patogênicas pode acarretar doenças aos consumidores, caso o alimento não sofra a ação de temperatura que elimine-as, ou caso a temperatura utilizada não seja suficiente para inativar a toxina produzida por algumas bactérias, como por exemplo, o *Staphylococcus aureus*.

Com a pesquisa, verificou-se também a eficácia da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase, para detecção precisa de bactérias em pescado e a sua menor demanda de tempo comparada aos métodos tradicionais.

5. Referências

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

AMSON, G.V; HARACEMIV, S.M.C; MASSON, M.L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (dtas) no estado do paraná – brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, nov./dez., 2006.

AQUINO, J.S., VASCONCELOS, J.C., INHAMUNS, A.J., SILVA, M.S.B. Estudo Microbiológico de pescado congelado comercializado em Manaus- AM. **B. Ceppa**, Curitiba, v.14, n.1, p. 1-10, jan./jun., 1996.

ASSIS, L. **Alimentos seguros: ferramentas para gestão e controle da produção e distribuição**. 2. ed. Rio de Janeiro: Senac Nacional, 2014. 73- 98p.

BARTZ, S. **Contaminação microbiológica e avaliação de métodos de higienização de panos de limpeza utilizados em serviços de alimentação**. 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 11p.

BRASIL. Resolução RDC nº12, de 02 de Janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, n. 7-E, p. 46-53.

BLUMER, C.; KLEEFELD, A; LEHNEN, D.; HEINTZ, M.; DOBRINDT, U.; NAGY, G.; MICHAELIS, K.; EMODY, L.; POLEN, T.; RACHEL, R.; WENDISCH, V.F.; UNDEN, G. (2005). Regulation of type 1 fimbriae synthesis and biofilm formation by the transcriptional regulator LrhA of *Escherichia coli*. *Microbiology*, [s.l.], v. 151, n. 10, p.3287-3298. **Society for General Microbiology**. DOI: 10. 1099/mic.0.28098-0.

CARMO, M.C.N.S; CORREIA, M.I.T.D. A importância dos ácidos graxos ômega -3 no câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.55, n.3, p. 279-287, 2009.

CASANOVA, M.A; MEDEIROS, F. Recentes evidências sobre os ácidos graxos poli-insaturados da família ômega- 3 na doença cardiovascular. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, Rio de Janeiro, p.74-80, jul./set., 2011.

CASTRO, M. M. de M. V. & IARIA, S. T. Staphylococcus aureus enterotoxigênico no vestíbulo nasal de manipuladores de alimentos em cozinhas de hospitais do município de João Pessoa, PB, Brasil. **Revista de Saúde pública**, São Paulo, v. 18, p. 235 - 245, 1984.

DESTRO, M.T. **Listeria monocytogenes em camarão (*Penaeus brasiliensis*): marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação em uma unidade processadora de pescado**. 1995. 142f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

DICKEL, E.L; RODRIGUES, L.B; SANTOS, L.R; VALLE, S,F; PILOTTO, F; RODEMBUSH, C; WALD, V.B; CANAL, C.W; NASCIMENTO, V.P. Análise comparativa entre microbiologia convencional, ELISA e PCR para detecção de *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum* e *S. pullorum* em carne de frango contaminada artificialmente. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 12, n. 1/3, p.5-10, jan./dez. 2005.

FEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO ESTADO DO MATO GROSSO (FAMATO). **Diagnóstico da Piscicultura em Mato Grosso**. Cuiabá: Instituto Mato-Grossense de Economia Agropecuária (Imea), 2014. 17p.

FERREIRA, D.M.S., PEREIRA, L.R.G., CUNHA, T., ACCIOLY, A.S., HELENA, A.A.S., HEINEN, R.C. Análise microbiológica de cédulas circulantes em feira livre do município de Belford Roxo, RJ. **Revista Saúde Física e Mental- Uniabel**, v.1, n.1, p. 11-14, ago./dez., 2012

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 607p.

FURTINI, L.L.R.; ABREU, L.R. Utilização de APPCC na indústria de alimentos. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 358-363, mar./abr. 2006.

FLÔRES, M. L.; NASCIMENTO, V. P.; KADER, I. I. T. A.; CARDOSO, M.; SANTOS, L. R.; LOPES, R. F. F.; WALD, V.B.; BARBOSA, T. M. C. Análise da contaminação por *Salmonella* em ovos do tipo colonial através da reação em cadeia da polimerase. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.3, p.553-557, mai./jun. 2003.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF.M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 176p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF.M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008. 07- 100p.

GANDRA, E.A.; FERNANDEZ, M.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.

GANDRA, E.Á.; GANDRA, T.K.V.; MELLO, W. S.; GODOI, H. S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v.30, n.1, p. 109-118, 2008.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 124 – 134p.

GOUVÊA, R; SANTOS, F.F; NASCIMENTO, E.R; FRANCO, R.M; PEREIRA, V.L.A. Isolamento bacteriológico e PCR na detecção de *Salmonella spp*. Em peito de

frango de estabelecimento varejista. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 8, n. 15, p. 1129-1137, 2012.

GHASEMI, M.S.A.; AZADNIA, P.; RAHNAMA, M.H. Bacterial Counts in Two Species (*Scomberomerus juttatus* and *Otolithes ruber*) of Fresh south-Harvested Fish, While Loading in Kazeroon. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.9, n.4, p.671-673, 2010.

GUINÉ, R.P.F; HENRIQUES, F. O papel dos ácidos gordos na nutrição humana e desenvolvimento sobre o modo como influenciam a saúde. **Millenium**. v.40, p. 7-21, 2011.

HUSS, H. H. **Garantia da Qualidade dos Produtos da Pesca**: Documento Técnico sobre as Pescas, nº334, FAO, Roma, 1997, 176p.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

LANZARIN, M., RITTER, D.O., SOUZA, G.G., MELLO, C.A., ALMEIDA FILHO, E.S. Quantificação de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e ocorrência de *Salmonella* spp. em híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*), comercializado em Cuiabá, Mato Grosso. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v.8, n.15, p. 1500-1509, 2012.

LIMA, M.F; HENRIQUES, C.A; SANTOS, F.D; ANDRADE, P.M.M; CARMO, M.G.T. Ácido graxo ômega 3 docosahexaenóico (dha: c22:6 n-3) e desenvolvimento neonatal: aspectos relacionados a sua essencialidade e suplementação. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**. v.28, p.65-77, 2004.

LOPES, I.S.; FERREIRA, E.M.; PEREIRA, D.M.; PEREIRA, L.S.; CUNHA, M.C.S.; COSTA, F.N. Pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) desembarcada: características microbiológicas e qualidade do gelo utilizado na sua conservação. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 71, n. 4, p.677-684, 2012.

LOTTENBERG, A.M.P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v.53, n.5, p.595-607, 2009.

MINISTÉRIO da Pesca e Aquicultura. 2014 **Apresenta dados sobre o consumo de peixe no país**. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/ultimas-noticias/382-semana-do-peixe-populariza-consumo-de-pescado-no-pais>>. Acesso em: 01 mar. 2016.

MURATORI, M.C.S., COUTO FILHO, C.C.C., ARARIPE, M.N.B.A., LOPES, J.B., COSTA, A.P.R. *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em manipuladores de piscicultura. **Revista Científica de Produção Animal**, v.9, n.2, p. 120-126, 2007.

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. **B.Ceppa**. Curitiba, v.12, n. 1, p. 33-38, jan./jun.1994.

NOVAIS, C.M.; ALVES, M.P. PCR em tempo real: Uma inovação tecnológica da Reação da Cadeia de Polimerase (PCR). **Revista biotecnologia ciência e desenvolvimento**. N°33, p.10-13, jul./dez. 2004.

OLIVEIRA, C.S.V. **Deteção de Escherichia coli o157:h7 em leite armazenado em diferentes condições por PCR**. 2012. 56f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2012.

OLIVEIRA, M.C.S.D. **Avaliação microbiológica e aplicação do método do índice de qualidade (MIQ) para pintado (Pseudoplatystoma sp.) estocado em gelo e comercializado em Brasília – DF**. 2015. 91f. Monografia (Apresentada para obtenção do grau de Farmacêutico) – Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2015.

PREZZI, J.A; DUARTE, K.M.R. Deteção de agentes patogênicos em animais de produção através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). **PUBVET**, Londrina, v.4, n.18, ed.123, art.831, 2010.

RITTER, D.O., LANZARIN, M., MELLO, C.A., FILHO, E.S.A. Qualidade bacteriológica de cacharas (*pseudoplatystoma fasciatum*) provenientes de piscicultura. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v.8, n.14, p. 1472-1480, 2012.

ROCHA, F.A.G., ARAÚJO, L.O., ALVES, K.S., DANTAS, L.Í.S., SILVA, R.P., ARAÚJO, M.F.F. Estafilococos coagulase positivos em filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*) comercializados no mercado Modelo Nerival Araújo, Currais Novos/RN. **Holos**, Currais Novos – RN, ano 29, v.1, p. 84-91, 2013.

SANTOS, C.A.M.L; RICHARDS-RAJADURAI, P.N. **The need for fish inspection and quality assurance**. FAO/INFOFISH Technical Training Manual 1, Kuala Lumpur, Malaysia, 33p, 1992.

SARTORI, A.G.O.; AMANCIO, R.D. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. **Segurança alimentar e nutricional**. Campinas, v.19, n.2, p. 83-93, 2012.

SILVA-JÚNIOR, A.C.S., SILVA, A.S.S., BRITO, T.P., FERREIRA, L.R. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes em Jaraqui, *Semaprochilodus brama* (Valenciennes, 1850) comercializado na Feira do Pescado, Macapá-AP. **Biota Amazônia Open Jornal System**, Macapá, v.5, n.1, p. 32-36, 2015.

SILVA, M.L.; MATTÉ, G.R.; MATTÉ, M.H. Aspectos sanitários da comercialização de pescado em feiras livres da cidade de São Paulo, SP/Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.67, n. 3, p. 208-214, 2008.

SOARES, C.M; AZEVEDO, R.M.C; KUAYE, A.Y. Análise da contaminação de preparações cárneas por *Bacillus cereus* em serviços de alimentação. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.16, n. 2, p. 169-175, abr./jun. 2005.

SOUSA, C.P.; Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: Utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista APS**, v.9, n.1, p.83-88, jan./jun. 2006.

SOUZA, A.T.S. Certificação da qualidade de pescados. **Biológico**, São Paulo, v.65, n.1/2, p.11-13, jan./dez., 2003.

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.

SUÁREZ-MAHECHA, H; FRANCISCO, A; BEIRÃO, L.H; BLOCK, J.M; SACCOL, A; PARDO-CARRASCO, S. Importância de Ácidos graxos poli-insaturados presentes em peixes de cultivo e de ambiente natural para a nutrição humana. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.28, n.1, p.101-110, 2002.

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.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934p.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. Ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 175-338p.