



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/ UNB
CURSO DE FARMÁCIA

DAVID DE OLIVEIRA SOUSA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE TILÁPIA FRESCA COMERCIALIZADA NO
DISTRITO FEDERAL E DO GELO UTILIZADO NA SUA CONSERVAÇÃO**

BRASÍLIA, DF

2019

DAVID DE OLIVEIRA SOUSA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE TILÁPIA FRESCA COMERCIALIZADA NO
DISTRITO FEDERAL E DO GELO UTILIZADO NA SUA CONSERVAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

Co-orientador: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

BRASÍLIA, DF

2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

DE OLIVEIRA SOUSA, DAVID

DD418q QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE TILÁPIA FRESCA COMERCIALIZADA NO
DISTRITO FEDERAL E DO GELO UTILIZADO NA SUA CONSERVAÇÃO

/ DAVID DE OLIVEIRA SOUSA; orientador DANIELA CASTILHO
ORSI; co-orientador IZABEL CRISTINA RODRIGUES DA SILVA. --
Brasília, 2019.
53 p.

Monografia (Graduação - FARMÁCIA) -- Universidade de
Brasília, 2019.

1. QUALIDADE DO PESCADO . 2. QUALIDADE DO GELO DE
CONSERVAÇÃO. 3. CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO. I.
CASTILHO ORSI, DANIELA, orient. II. RODRIGUES DA SILVA,
IZABEL CRISTINA, co-orient. III. Título.

DAVID DE OLIVEIRA SOUSA

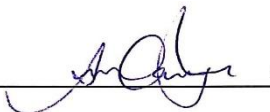
**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE TILÁPIA FRESCA COMERCIALIZADA NO
DISTRITO FEDERAL E DO GELO UTILIZADO NA SUA CONSERVAÇÃO**

BANCA EXAMINADORA



Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

(FCE/ Universidade de Brasília)



Mestranda Ana Carolina Almeida de Oliveira Ferreira

(FCE/ Universidade de Brasília)



Mestranda Sabrina Lunara Santos Pavelquesi

(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2019

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais amados e determinados por terem insistido e não desistido, a Deus, por me guiar e proteger, a minhas irmãs por sempre estarem ao meu lado, aos meus queridos sobrinhos, às amigas que o Distrito Federal me presenteou e às que de longa data fazem parte de minha história, a professora Daniela pela paciência e excelente orientação, a Profa. Izabel pela coorientação e a todos que de alguma forma se fizeram presente na minha vida durante esta jornada.

RESUMO

Considerando que a tilápia é o peixe de água doce mais cultivado e consumido no Brasil, o objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade microbiológica de amostras de tilápia fresca comercializadas no Distrito Federal e avaliar a qualidade do gelo utilizado na sua conservação. Os resultados mostraram que do total de seis amostras de tilápia fresca analisadas (4 amostras de filé e 2 amostras de peixe inteiro), quatro amostras (3 amostras de filé e 1 amostra de peixe inteiro) mostraram a presença de *Salmonella enterica* e, portanto, estavam impróprias para o consumo. Essas amostras foram confirmadas pela detecção do gene *invA* na análise molecular. Todas as amostras de gelo de manutenção do pescado estavam impróprias para o uso devido a presença de coliformes totais. E como agravante das seis amostras de gelo analisadas, quatro amostras tiveram enumeração de coliformes termotolerantes, sendo possível isolar *E. coli* dessas amostras que foram confirmadas na análise molecular através da amplificação do gene *MalB*. De acordo com a legislação brasileira, os coliformes totais e coliformes termotolerantes devem estar ausentes em 100 mL de água do gelo, para garantir os critérios de potabilidade do mesmo. O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas de *Salmonella enterica* isoladas das amostras de tilápia fresca, mostrou que do total de 21 cepas isoladas, 95,2% das cepas foram resistentes à associação de Amoxicilina com ácido clavulânico e a Tetraciclina (95,2%) e houve elevado índice de resistência a Sulfonamida (90,5%). Todas as cepas testadas (100%) apresentaram resistência a pelo menos 2 dos antimicrobianos testados. E a maioria das cepas (19 cepas, 90,5%) apresentou perfil de multirresistência antimicrobiana. Conclui-se nesse estudo que a tilápia fresca comercializada no Distrito Federal e o gelo utilizado na sua conservação carecem de qualidade microbiológica e podem oferecer risco a saúde do consumidor pela possibilidade da veiculação de microrganismos patogênicos causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos.

Palavras-chave: pescado, *Salmonella enterica*, gelo, *Escherichia coli*, PCR, resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

Considering that tilapia is the most cultivated and consumed freshwater fish in Brazil, the objective of the present study was to evaluate the microbiological quality of fresh tilapia samples commercialized in the Federal District and to evaluate the quality of the ice used in its conservation. The results showed that four samples (3 fillet samples and 1 whole fish sample) of the six fresh tilapia samples analyzed (4 fillet samples and 2 whole fish samples) showed the presence of *Salmonella enterica* and, therefore, were unfit for consumption. These samples were confirmed by detection of the *invA* gene in molecular analysis. All fish keeping ice samples were unfit for use due to the presence of total coliforms. And as an aggravating factor of the six ice samples analyzed, four samples had enumeration of thermotolerant coliforms, and it was possible to isolate *E. coli* from these samples that were confirmed in the molecular analysis through the amplification of the *MalB* gene. According to Brazilian legislation, total coliforms and thermotolerant coliforms must be absent in 100 mL of ice water, to guarantee the criteria for its potability. The antimicrobial susceptibility profile of *Salmonella enterica* strains isolated from fresh tilapia samples showed that of the total of 21 strains isolated, 95.2% of the strains were resistant to the combination of Amoxicillin with clavulanic acid and Tetracycline (95.2%) and there was a high resistance index to Sulfonamide (90.5%). All strains tested (100%) showed resistance to at least 2 of the tested antimicrobials. And most of the strains (19 strains, 90.5%) showed antimicrobial multiresistance profile. It is concluded in this study that fresh tilapia marketed in the Federal District and the ice used in its conservation lack microbiological quality and may pose a risk to the consumer's health due to the possibility of the transmission of pathogenic microorganisms that cause Foodborne Diseases.

Keywords: fish, *Salmonella enterica*, ice, *Escherichia coli*, PCR, antimicrobial resistance

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3. JUSTIFICATIVA.....	25
4. ARTIGO ELABORADO CONFORME AS NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA HIGIENE ALIMENTAR.....	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	29
RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO.....	42
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA.....	46
ANEXO 1. Antibiograma das bactérias <i>Salmonella enterica</i> isoladas das amostras de tilápia fresca.....	54
ANEXO 2. NORMAS DE SUBMISSÃO PARA A REVISTA HIGIENE ALIMENTAR.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos primers e tamanho dos produtos amplificados na PCR para identificação dos genes <i>Sec</i> , <i>invA</i> e <i>MalB</i>	31
Tabela 2. Análises microbiológicas das amostras de tilápia fresca.....	33
Tabela 3. Análises moleculares das amostras de tilápia fresca.....	36
Tabela 4. Análises microbiológicas das amostras de gelo.....	37
Tabela 5. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias <i>Salmonella enterica</i> isoladas das amostras de tilápia fresca.....	38
Tabela 6. Número de cepas de <i>Salmonella enterica</i> isoladas das amostras de tilápia fresca com resistência aos antimicrobianos testados.....	39

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Antibiograma das bactérias <i>Salmonella enterica</i> isoladas das amostras de tilápia fresca.....	53
ANEXO 2. NORMAS DE SUBMISSÃO PARA A REVISTA HIGIENE ALIMENTAR.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI – Brain Heart Infusion
CIM – Concentração Inibitória Mínima
DTA – Doenças Transmitidas por Alimentos
DNOCS - Departamento Nacional de Obras Contra a Seca
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FA – Fenilalanina
FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations
g – gramas
°C- grau Celsius
GTA – Guia de Trânsito Animal
hs – horas
H₂S – ácido sulfídrico
IPS-1(SPI-1, sigla em inglês) – Ilhas de patogenicidade em *Salmonella* spp.
LIA – Lisina Iron Agar
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL - mililitros
OMS – Organização Mundial de Saúde
ppm – Parte por milhão
SCV – Vacúolo que contém *Salmonella* spp.
SIFs – Filamentos Induzidos por *Salmonella* spp.
Subsp. – Subespécie
SS – Salmonella Shigella
TSA – Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos
TSI – Três Açúcares e Ferro
PCR – Reação em Cadeia de Polimerase
XLD – ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato
UFC – Unidade Formadora de Colônia

1. INTRODUÇÃO

1.1 Piscicultura da tilápia e consumo do pescado no Brasil

A Piscicultura, uma das formas mais comuns de aquicultura, abrange o cultivo comercial de peixes, em tanques, lagos, lagoas, rios e oceanos, para consumo alimentar (SEBRAE, 2015). É uma atividade que objetiva cultivar peixes de forma racional, garantindo um controle sobre o crescimento e reprodução das espécies cultivadas (GATTI JÚNIOR, 2011). Seu surgimento remonta a Idade Antiga, pelos egípcios, quando estes cultivavam espécies de peixes em tanques que seriam utilizados posteriormente em sua alimentação, mas tal atividade intensificou-se apenas no século XX (FIGUEIREDO & VALENTE, 2008).

No Brasil, a piscicultura baseia-se principalmente no cultivo de tilápias, carpas, tambaquis, tambacus e pacus (ROCHA et. al., 2013) e segundo dados da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), as espécies mais frequentes produzidas no país, por região, são: i) tambaqui, pirarucu e pirapitinga na região Norte; ii) tilápia e camarão marinho no Nordeste; iii) tambaqui, pacu e pintado no Centro-Oeste; iv) tilápia, pacu e pintado no Sudeste; e v) carpa, tilápia, jundiá, ostra e mexilhão na região Sul (EMBRAPA, 2017).

No quesito produção nacional de pescado por região, em 2015, a região Sul apresentou uma produção de 42% do pescado, acompanhada pelas regiões Sudeste com 26%, Nordeste em torno dos 24% e Centro-Oeste com 8%, além dessas, apesar de sua produção ser inferior a 1% da produção nacional, a região Norte não pode ser deixada de ser citada, uma vez que esse baixo índice de produção é devido à restrição do cultivo de tilápia por questões legais, já que é considerada uma espécie exótica. De uma maneira abrangente pode-se inferir um crescimento na produção do pescado em todo o território brasileiro desde a implantação da piscicultura no país, verificando a consolidação do cultivo como atividade comercial (SCHULTER & VIEIRA FILHO, 2017).

A introdução da tilápia como espécie cultivada na Piscicultura brasileira data de 1953 quando uma empresa privada, em São Paulo, importou a espécie *Tilapia rendalli*. Posteriormente, no ano de 1971, visando a ocupação dos reservatórios da região nordeste, o Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) introduziu a *Oreochromis niloticus*, conhecida como tilápia do Nilo. Em 1981 foi

introduzida e espécie *Oreochromis mossambicus*, a tilápia de Moçambique ou tilápia vermelha (SILVA, 2014). As primeiras espécies foram introduzidas pelo DNOCS com o intuito de proporcionar a produção de alevinos para o peixamento, espécie de repovoamento dos reservatórios públicos da região Nordeste e para o fomento do cultivo (SCHULTER & VIEIRA FILHO, 2017).

Sabe-se que há centenas de espécies de tilápia, distribuídas em três principais gêneros, *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia*. Dentre as espécies produzidas no Brasil, merecem destaque: a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*); a tilápia de Zanzibar (*Tilapia rendali*); uma variedade desenvolvida em Israel conhecida como Saint-Peters, de coloração escura e maxilas protráteis (*Sarotherodon hornorum*) e a tilápia tailandesa, uma nova variedade de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (PIZAIA et al., 2008).

O pescado é um dos alimentos cujo consumo cresce vertiginosamente, já que possui elevado valor nutricional, sendo fonte de proteínas de alto valor biológico, ácidos graxos insaturados e vitaminas, assim como, apresenta baixo teor de colesterol, constituindo uma opção de consumo mais saudável do que as outras carnes (GONÇALVES, 2011), estando associado à redução do risco de doenças cardiovasculares (SARTORI; AMANCIO, 2012).

Sendo assim, no Brasil a ampliação do cultivo da tilápia tem sido incentivado pela demanda de mercado devido a sua boa aceitação pelos consumidores, ao sabor agradável, ao seu valor nutritivo e aos preços acessíveis. O grande interesse pela tilápia também está atrelado aos piscicultores que a estão produzindo em todo o País, principalmente pela facilidade de cultivo, o que desperta o interesse das indústrias em processar este peixe (SIMÕES et. al, 2007). Além disso o seu cultivo destaca-se devido à resistência a algumas doenças, tolerância ao cultivo em altas densidades e em ambientes hostis e estressantes, o que a tornou rapidamente a espécie preferida pela aquicultura (JÚNIOR & JÚNIOR, 2008).

Recentemente um levantamento realizado pela Associação Brasileira da Piscicultura (PEIXE BR) apontou que a produção brasileira de Tilápia foi de 357.639 mil toneladas em 2017, o que equivale a 51,7% do total das espécies produzidas no país, colocando o Brasil na 4ª posição entre os maiores produtores do mundo, ficando atrás apenas da China (1º), Indonésia (2º) e Egito (3º) (PEIXE B.R., 2018).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), até 2030 o país poderá chegar a produção anual de aproximadamente 20 milhões de toneladas, assumindo um relevante papel no abastecimento do pescado mundial (SCHULTER & VIEIRA FILHO, 2017). Além disso, o Relatório Intrafish prevê que o Brasil produzirá 500 mil toneladas de Tilápia em 2020, mas não há fonte que confirme essa informação, porém a realidade dos investimentos aponta a possibilidade de se chegar a essa estatística já em 2019 (PEIXE B.R., 2018).

1.2 Gelo de conservação e sua relevância na qualidade do pescado

A conservação do pescado é uma das etapas cruciais para manter a qualidade do mesmo. Desde tempos remotos o frio é utilizado para conservar o pescado através do uso de gelo, na tentativa de aumentar a sua vida de prateleira (OETTERER et.al., 2012). No Brasil a comercialização do pescado se dá principalmente in natura e congelado. A comercialização in natura ocorre pela refrigeração do produto em gelo e câmara fria a 0° C e, segundo a *Food & Drug Administration* esta temperatura não deve ultrapassar os 4°C (FDA, 2011).

Nos supermercados e peixarias, o pescado deve estar exposto totalmente envolvido no gelo, ou seja, em camadas gelo-peixe, e não apenas com gelo embaixo ou em cima dos peixes (PEREIRA et.al., 2009). A utilização de baixas temperaturas para conservação se faz importante em todas as etapas de produção, evitando a rápida deterioração do pescado.

Quando vivos, os peixes possuem musculatura livre de microrganismos patogênicos. No pós-morte, ocorre o relaxamento da musculatura, tornando o pescado mole, essa fase chama-se pré-rigor. Após algumas horas o músculo se contrai, e torna inflexível, duro e rígido, é a fase de rigor mortis. Depois de horas, acontece o relaxamento do músculo, conhecido como pós-rigor, fase essa onde se inicia a decomposição. Dessa forma as baixas temperaturas impedem os processos de autólise, retardando a atividade de microrganismos que atuam no processo de decomposição, garantindo a qualidade do pescado por mais tempo (PEREIRA et.al., 2009; TAVARES & GONÇALVES, 2011).

Apesar de todos os benefícios que a conservação do pescado em gelo proporciona, é necessário dar atenção especial também à produção de gelo, uma vez

que há um risco potencial de transmissão de doenças de veiculação hídrica pelo consumo de gelo contaminado. Sendo assim a diretoria do Centro de Vigilância Sanitária recomenda que qualquer que seja o gelo, se for destinado para o consumo humano ou que venha a ter contato direto com alimentos deverá ser fabricado a partir de água que esteja dentro dos padrões de potabilidade estabelecido, dessa maneira o pH deve estar ente 6,0 a 9,5; turbidez menor que 2,0 NTU; cloro residual livre entre 0,5 e 2,0 ppm; a contagem de mesófilos deve ser no máximo de $5,0 \times 10^2$ UFC/mL e a ausência de coliformes totais e termotolerantes em 100 mL de água deverá prevalecer (BRASIL, 2004).

Segundo a Portaria nº326 de 30 de julho de 1997, a utilização de gelo na conservação de alimentos, além do que discriminado acima, deverá ser livre de qualquer substância que possa contamina-lo, bem como ser danosa à saúde humana, seguido o padrão de potabilidade instituído nas legislações vigentes (BRASIL, 1997). Apesar de não ser um meio de cultivo para o desenvolvimento de microrganismos, devido à escassez de nutrientes, o gelo se comporta como um potencial veiculador de contaminação ao pescado, se preparado com água contaminada por microrganismos que suportem temperaturas próximas a 0°C (VIEIRA; SAKER-SAMPAIO, 2004).

As agências reguladoras nacionais visando evitar a contaminação das águas, como medida preventiva de saúde pública, utilizam a Portaria nº 2.914/2011/MS como instrumento norteador de fiscalização de águas para consumo humano, o qual preconiza a utilização de cloro em águas, sendo que deverá conter um mínimo de 0,2 mg/L de cloro residual, sendo obrigatória sua manutenção em qualquer ponto da rede de distribuição e sem afetar os parâmetros de potabilidade.

Um estudo publicado em 2004, demonstrou que a produção de gelo com água clorada reduziu a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos na carne do pescado, aumentando em torno de 3 dias a vida de prateleira do peixe (SCHERER et al., 2004). Logo, a produção de gelo com água clorada possui um impacto positivo tanto na comercialização do pescado, como também na saúde pública brasileira, já que contribui para a redução de doenças propagadas pelo consumo de água contaminada por microrganismos patogênicos.

1.3 Microbiologia e qualidade do pescado

Os alimentos que são retirados de águas marítimas, doces ou salobras, e que servem para alimentar o homem são denominados pescado. A carne de peixe apresenta um elevado valor nutricional e uma facilidade de deterioração, principalmente por possuir pH próximo a neutralidade, elevada atividade de água nos tecidos, elevado teor de nutrientes facilmente utilizáveis pelos microrganismos, acentuado teor de fosfolipídios e rápida ação destrutiva das enzimas presentes nos tecidos e nas vísceras do peixe (SOARES & GONÇALVES, 2012).

O pescado, além da contaminação por microrganismos, pode ser contaminado por resíduos de produtos químicos, através de águas poluídas e até mesmo por falta de cuidados básicos de armazenamento, exposição e manipulação (CAMPOS & PAIVA, 2012). No pescado vivo observa-se a presença de bactérias contaminantes principalmente na pele, brânquias e escamas, passando aos demais tecidos após a morte do animal (SANTIAGO et al., 2013). Diante disso, o cuidado com o pescado deve ser em todas as etapas de produção, desde o cultivo, passando pelo processamento e armazenamento, até o consumo final, sempre visando garantir a boa qualidade do produto.

Desta forma, procedimentos inadequados em qualquer fase de produção do pescado podem ocasionar a contaminação do mesmo, como no desembarque, onde a manipulação inequívoca pode acarretar na ruptura da cavidade abdominal ou até a exposição por longo tempo à temperatura ambiente, e no processo de filetagem, quando o manuseio se faz em condições higiênicas não apropriadas, como no caso de uso de utensílios contaminados e em mesas não higienizadas. Outra situação ocorre por conta dos próprios manipuladores, que ao entrarem em contato direto com o pescado não estão usando roupas e instrumentos adequados. Além desses, há também o transporte sem nenhum cuidado com a manutenção da temperatura e a falta de refrigeração nos pontos de comercialização, contribuindo para os processos de deterioração do pescado (SOARES et. al., 2011). E a contaminação do mesmo por gelo fora dos parâmetros de potabilidade, durante a refrigeração (VIEIRA; SAKER-SAMPAIO, 2004).

A superfície externa de peixe e as brânquias contém vários gêneros de bactérias como: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*. Estes

e outros microrganismos, como os potencialmente patogênicos (*Salmonella*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*), podem estar presentes no pescado principalmente devido à sua extensa cadeia produtiva (beneficiamento, conservação, distribuição, transporte, armazenamento) até alcançar o consumidor final (BARBOSA, 2013; SANTIAGO et al., 2013).

Em relação aos coliformes totais e termotolerantes ou fecais, o primeiro grupo é constituído por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, fermentadores de lactose com produção de gás, quando incubados a 35-37°C, por 48 horas. Fazem parte desse grupo predominantemente bactérias pertencentes aos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Dentre estas, somente a *Escherichia coli* coloniza primariamente o trato intestinal do homem e animais de sangue quente. Os demais, além de fezes, podem ser encontrados na vegetação e no solo. A presença de coliformes totais no alimento não indica, obrigatoriamente, contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos. Já os coliformes termotolerantes, fermentam lactose com produção de gás, quando incubadas a temperaturas entre 44-45°C e são bastante utilizados como parâmetro microbiológico quando se quer determinar a presença de contaminação fecal (FERREIRA, et. al, 2014).

A determinação de coliformes assume importância como parâmetro indicador da probabilidade da existência de microrganismos patogênicos, responsáveis pela disseminação de doenças de veiculação hídrica, tais como cólera, desintéria bacilar, febre tifoide e febre paratifoide (DARWIN FUTURO, 2009). Apesar de alguns trabalhos relatarem a presença de coliformes no trato intestinal de peixes, estes não são considerados habitantes naturais da sua microbiota intestinal, permitindo correlacionar com as condições microbiológicas da água onde o peixe se encontra (BARBOSA, 2013).

A bactéria *Escherichia coli*, gram-negativa e colonizadora do intestino de mamíferos, é classificada como uma bactéria do grupo dos coliformes termotolerantes e a principal causadora de doenças diarreicas via ingestão de água e alimentos contaminados. A bactéria habita o trato intestinal do homem e animais de sangue quente e, portanto, sua presença no meio indica contaminação fecal (SANTIAGO, et. al., 2013). Várias linhagens de *E. coli* adquiriram fatores de virulência específicos, que conferem uma maior capacidade em se adaptar a novos nichos e ocasionar um amplo espectro de doenças (CARDOZO, 2014). As linhagens patogênicas de *E. coli* são

divididas de acordo com os sintomas clínicos e com os mecanismos da patogenicidade em seis grupos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* difusamente adesiva (DAEC) (FIB, 2011).

As bactérias do gênero *Salmonella*, gram-negativas não formadoras de esporos, são microrganismos amplamente distribuídos pelo mundo, causadores de patologias de grande preocupação para a saúde pública, como gastroenterite em humanos. Estão comumente associadas à ingestão de alimentos como ovos, carne de aves e suínos, sendo também isoladas de outras fontes como água, vegetais e pescado (MOREIRA, 2012). Sabe-se que a contaminação do pescado por *Salmonella* spp. está relacionada ao seu cultivo, bem como ao ambiente de sua industrialização, devido a práticas de higiene ineficientes, equipamentos e manuseio inadequados (FERNANDES et al., 2018). Além disso uma possível fonte para a contaminação do pescado pode estar relacionada com a alimentação fornecida aos cardumes durante a cadeia de produção, já que através da introdução de matérias-primas contaminadas nas fábricas de rações, as cepas de *Salmonella* que ali se encontram podem seguir por anos como uma “linhagem doméstica” (NESSE et al., 2003).

Staphylococcus aureus são bactérias gram-positivas, pertencem à família *Micrococcaceae*, possuem células esféricas (cocos), são mesófilas, porém crescem a temperatura entre 7-47,8°C, toleram alta concentração de 10 a 20% de NaCl, mas não produzem toxinas em concentrações superiores a 5% de NaCl. São anaeróbias facultativas, produtoras de uma grande variedade de fatores de patogenicidade e virulência: estafiloquinases, hialurodinases, fosfatases, coagulases e hemolisinas (FIB, 2011), sendo responsáveis por surtos de intoxicação alimentar oriundos da formação de toxinas estafilocócicas ao consumir alimentos contaminados (ROCHA, et. al, 2013). A contaminação dos alimentos por *Staphylococcus aureus* está relacionada sobretudo ao ser humano, uma vez que este é considerado o seu principal reservatório, sendo que 30-50% de indivíduos saudáveis tem as fossas nasais, garganta e pele colonizados por *Staphylococcus aureus*. A transmissão ocorre devido a ferimentos nas mãos ou outras lesões na pele e principalmente pela tosse e espirros, que contaminam os alimentos durante sua manipulação (SES-SP, 2013).

A presença de tais microrganismos como agentes de contaminação no pescado, está atrelada a inúmeros fatores, como por exemplo, durante a pós-captura quando o pescado é armazenado nos porões dos barcos pesqueiros sem condições de higiene; durante o trajeto para o porto, em contato com gelo produzido a partir de água que não atende aos padrões de potabilidade; no cais do entreposto ao ser lavado com água proveniente dos canais contaminados com matéria orgânica; nos caminhões mal refrigerados durante o transporte do porto para as fábricas ou armazéns distribuidores e, em toda a etapa de distribuição até alcançar o comércio varejista ou o domicílio do consumidor. É crucial salientar que em todas essas etapas a refrigeração é de suma importância para a conservação do pescado, assim como a higiene das instalações e a qualidade da água (SANTIAGO et al., 2013).

1.4 Análise molecular na identificação de bactérias

O uso de técnicas ditas tradicionais nas análises microbiológicas aplicadas para os mais variados tipos de amostras data de décadas (DO NASCIMENTO, 2008). Apesar de serem bastante utilizadas essas técnicas apresentam limitações, especialmente para detecção de patógenos que ocorrem em números reduzidos e com distribuição não homogênea (GONÇALVES et al., 2014). Uma alternativa foi implantar técnicas moleculares para a caracterização, identificação e detecção de bactérias patogênicas, já que tais técnicas se utilizam da caracterização do DNA cromossômico, plasmidial ou até de um microrganismo (POSTOLLEC et al., 2011).

Introduzida em 1983, a reação em cadeia da polimerase (PCR), foi desenvolvida por Kary B. Mullis (MULLIS; FALOONA, 1987) e trouxe grande progresso na área da biologia molecular. É um método “in vitro” utilizado para amplificação de material genético, através de uma pequena quantidade de ácido nucléico, onde se obtém um fragmento específico de DNA de sequência definida. Esta técnica expandiu o alcance da análise de DNA e proporcionou a biologia molecular encontrar novas aplicações inclusive em áreas, como a medicina, agricultura e biotecnologia (STOCCO, 2017).

A técnica de PCR visa amplificar uma sequência alvo-específica através da enzima DNA polimerase termoestável, in vitro. Além da enzima, utiliza-se nucleotídeos e um par de primers (em torno de 20 pares de base) que irão limitar a região do DNA

que será amplificada. Os primers são utilizados para direcionar a síntese do DNA, em uma série de ciclos que envolvem desnaturação do DNA molde, ligação dos iniciadores e extensão da cadeia pela DNA polimerase. A enzima DNA polimerase é a responsável pela amplificação e multiplicação da fita molde. Com esta amplificação, a reação PCR é capaz de identificar o microrganismo a partir do seu material genético. A reação de PCR em tempo real permite o acompanhamento de todas as etapas da reação no momento em que acontece, já na PCR convencional os resultados são obtidos somente no final do procedimento (DE MEDEIROS, 2013; CHEN et al., 2010).

A PCR em tempo real quantitativa ou qPCR ou RTQ-PCR, foi descrita pela primeira vez em 1993, por Higuchi e seus colaboradores. Nessa PCR, foi montado um sistema de acoplamento onde uma câmara de vídeo está acoplada, de modo a monitorizar a PCR durante todos os ciclos, permitindo detectar o aumento da fluorescência durante a reação, devido à ligação do brometo de etídio às moléculas de DNA de dupla cadeia recém-sintetizada. Já a PCR em tempo real envolve as etapas da PCR convencional acrescida de um fluoróforo, uma molécula que quando excitada por uma fonte de luz (laser), irá emitir uma fluorescência que posteriormente será detectada por uma luz UV acoplada ao termociclador (GANDRA et al., 2008).

O produto da reação da PCR é normalmente visualizado através de eletroforese em gel. Outros métodos analíticos podem ser aplicados com a finalidade de detecção dos produtos da PCR, tais como, Southern blotting, ensaio ELAHA (enzyme-linked amplicon hybridization assay), ensaio ELOSA (enzyme-linked oligosorbent assay), entre outros (OLIVEIRA, 2010). Com isso, a amplificação de DNA utilizando a PCR tornou-se mais uma alternativa para a detecção de bactérias patogênicas em alimentos. Esta técnica pode auxiliar no controle de microrganismos causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos, pois com ela é possível detectar e localizar os agentes patogênicos (DE MEDEIROS, 2013).

1.5 Resistência bacteriana a antimicrobianos

Atualmente uma das grandes preocupações pelos organismos internacionais e nacionais que envolvem a saúde pública é a aquisição de resistência pelas bactérias aos agentes antimicrobianos. Define-se resistência antimicrobiana como a capacidade de microrganismos de impedir que um determinado agente antimicrobiano

atue sobre ele, resultando em tratamentos ineficazes, infecções persistentes e a possibilidade de transmitir essa característica a outros microrganismos (WHO, 2018). A resistência antimicrobiana é considerada um dos maiores desafios aos sistemas de saúde da atualidade, já que os antimicrobianos são prescritos e dispensados irracionalmente, estando entre a classe de medicamentos mais prescritas nos dias de hoje. Estima-se que 700 mil mortes sejam causadas anualmente pela resistência aos antimicrobianos e se não houver uma transformação no enfoque para conter o problema, até 2050, a resistência a antimicrobianos poderá causar mais mortes que o câncer (ESTRELA, 2018).

O uso incontrolado dos antimicrobianos ocorre desde a descoberta da penicilina de maneira corriqueira. Muitos microrganismos patogênicos foram se adaptando a estes fármacos que eram administrados com um único objetivo, exterminá-los, tornando os seus efeitos muitas vezes ineficazes (SILVA & AQUINO, 2018). Infelizmente a resistência antimicrobiana é um campo em constante evolução, onde o desenvolvimento e o uso de novos agentes antimicrobianos são geralmente seguidos pela ocorrência de bactérias que apresentam alguma resistência a esses agentes. Isto se aplica não só aos antimicrobianos utilizados na medicina humana, mas também aos utilizados na agricultura e na medicina veterinária (MICHAEL et al., 2015). Nas últimas décadas, cada vez que se introduz um novo antimicrobiano na prática clínica, e com o decorrer do seu uso, verifica-se um padrão de evolução de resistência partindo dos hospitais para a comunidade (ATIQUE et al., 2012).

A resistência bacteriana é evidenciada através da expressão dos genes de resistência, que irão determinar o funcionamento dos processos bioquímicos e estruturais envolvidos no mecanismo de falha do antimicrobiano. Os mecanismos de resistência podem ser naturais do microrganismo, denominados intrínsecos ou adquiridos pela transmissão de material genético ou mutação, designados como extrínsecos (BAPTISTA, 2013).

O mecanismo de resistência intrínseca é aquele mecanismo de resistência natural de um gênero ou espécie bacteriana, onde cada membro de uma dada espécie apresentará resistência a um fármaco sem que haja alteração genética, transmissão dita vertical uma vez que passa de geração para geração. Já o mecanismo de resistência extrínseca envolve mutações nos próprios genes ou pela aquisição dos genes de resistência de outras bactérias, via bacteriófago ou via ambiente, que podem

ser através da diminuição da permeabilidade da membrana externa da parede bacteriana; pela fabricação de enzimas que inativam ou diminuem a ação dos agentes antimicrobianos; pelo bloqueio do sítio de ligação do antibiótico; através de sistemas de efluxo hiperexpressos e alteração do sítio de ligação do antimicrobiano (FRANÇA, 2017).

Vários estudos têm demonstrado a evolução da resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos há anos. Recentemente a Organização Mundial de Saúde (OMS) disponibilizou uma lista de microrganismos resistentes aos antimicrobianos, destacando 12 que representarão uma severa ameaça à saúde em nível global: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Shigella spp.*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter spp.*, *Salmonellae*, *Neisseria gonorrhoeae*. Os microrganismos selecionados pela OMS foram avaliados de acordo com o grau de severidade das infecções que provocam, seu poder de disseminação e o número de antibióticos disponíveis que ainda são capazes de combatê-los (VIEIRA, 2017).

Dentre os microrganismos mencionados, a *Salmonella* spp. merece destaque por provocar infecções alimentares em humanos, não estando restrita somente ao ambiente hospitalar, podendo ser encontrada em alimentos consumidos corriqueiramente, estando sua disseminação relacionada à produção intensiva de alimentos de origem animal (MOREIRA et. al. 2013).

O aumento no isolamento de cepas de *Salmonella* spp. resistentes a antibióticos têm sido associado ao uso indiscriminado de antimicrobianos em animais de produção (BOXSTAEL et. al., 2012). Esse fato representa um risco para a saúde pública pela possibilidade de transferência de cepas resistentes de *Salmonella* spp. aos humanos em função do consumo de alimentos contaminados (TUNON et al., 2008). O isolamento de fenótipos multirresistentes (MRs) vem sendo documentado em amostras clínicas e na produção de alimentos de origem animal, incluindo o ciclo de produção avícola e suína, além de alimentos derivados (DA SILVA, 2011).

A ocorrência de cepas de *Salmonella* resistentes a um ou vários antimicrobianos é verificada em vários sorotipos, porém no sorotipo Typhimurium isolado de humanos e animais essa resistência é acentuada. Os espectros de resistência a drogas das cepas de *Salmonella* também têm se expandido nos últimos

anos, especialmente para as ampicilinas, sulfametoxazol+trimetoprim e o cloranfenicol (MOREIRA et al., 2013). Como mecanismos de resistência, a aquisição de genes codificadores de betalactamases, transferases modificadoras de aminoglicosídeos e fenicóis tem sido associado a fenótipos de MR em *Salmonella* spp. Além disso, a super expressão de bombas de efluxo tem sido descrita como um mecanismo de resistência que reconhece um amplo espectro de antibióticos independente da sua composição química (DA SILVA, 2011).

Um dos métodos bastante empregado para se avaliar a susceptibilidade de bactérias a agentes bacterianos é o método de disco-difusão, conhecido como antibiograma. Este método, também chamado de Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA) é uma das abordagens mais antigas para realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos e permanece como um dos mais amplamente utilizados na rotina dos laboratórios clínicos. É adequado para testar a maioria dos patógenos bacterianos, incluindo as bactérias fastidiosas mais comuns, é versátil em relação a gama de agentes antimicrobianos que podem ser testados e não requer equipamento especial (BrCAST, 2017).

O princípio básico do antibiograma, consiste na difusão do antimicrobiano na superfície do ágar, a partir de um disco impregnado com o mesmo antimicrobiano, essa difusão acarreta na formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano. Quando os halos de inibição são correlacionados aos valores logarítmicos da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela análise de regressão linear, encontra-se uma relação linear consistente demonstrando que o halo de inibição é inversamente proporcional à CIM daquele antimicrobiano (BRASIL, 2008). Com o intuito de simplificar, introduziu-se um esquema padronizado de avaliação baseado em limiar, no qual a amostra é classificada em "susceptível (S)", "intermediário (I)" ou "resistente (R)", dependendo do valor da CIM (RODLOFF et al., 2008).

O teste é adequado para testar a maioria dos patógenos bacterianos, incluindo as bactérias fastidiosas mais comuns, é um método prático, de fácil execução e ideal para bactérias de crescimento rápido, além de ser uma técnica pouco onerosa (BrCAST, 2017). Entretanto, apresenta algumas limitações, como quando utilizado para bactérias que requerem suplementação dos meios de cultura e a dificuldade na avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos que se difundem mal através do ágar, como por exemplo, a polimixina. Apesar das limitações, o antibiograma é um

dos testes mais importantes e realizados no laboratório, pois é ele que irá direcionar a escolha da terapia antimicrobiana.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica de amostras de tilápia fresca comercializadas no Distrito Federal e do gelo utilizado na sua conservação.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar as análises bacteriológicas nas amostras de tilápia: contagem total dos microrganismos mesófilos e psicotróficos, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus*, pesquisa de *Escherichia coli* e pesquisa de *Salmonella* spp.
- Realizar as análises bacteriológicas nas amostras de gelo: determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes.
- Realizar genotipagem através da técnica de PCR para confirmação dos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.
- Realizar teste de susceptibilidade antimicrobiana das bactérias *Salmonella* isoladas utilizando o método de difusão com disco.

3. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que nas últimas décadas o consumo de pescado no país tem crescido vertiginosamente, sendo que o pescado, quando não se encontra dentro dos parâmetros de qualidade aceitáveis para o consumo humano, se torna um veiculador de microrganismos patogênicos ao homem, podendo causar as Doenças Transmitidas por Alimentos, que algumas vezes podem levar a óbito. Considerando a representatividade que o Distrito Federal possui no mercado consumidor de pescado, e sendo a tilápia o peixe de água doce mais cultivado e consumido no Brasil, a realização deste trabalho se justifica, uma vez que visa avaliar a qualidade microbiológica de amostras de tilápia comercializadas no Distrito Federal e avaliar a qualidade do gelo utilizado na sua conservação.

4. ARTIGO ELABORADO CONFORME AS NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA HIGIENE ALIMENTAR

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE TILÁPIA FRESCA COMERCIALIZADA NO DISTRITO FEDERAL E DO GELO UTILIZADO NA SUA CONSERVAÇÃO

David de Oliveira Sousa, Izabel Cristina Rodrigues da Silva, Daniela Castilho Orsi.

Universidade de Brasília (UNB/FCE), Faculdade de Farmácia, Laboratório de Controle de Qualidade, Ceilândia, Brasília - DF, Brasil.

RESUMO

Considerando que a tilápia é o peixe de água doce mais cultivado e consumido no Brasil, o objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade microbiológica de amostras de tilápia fresca comercializadas no Distrito Federal e avaliar a qualidade do gelo utilizado na sua conservação. Os resultados mostraram que do total de seis amostras de tilápia fresca analisadas (4 amostras de filé e 2 amostras de peixe inteiro), quatro amostras (3 amostras de filé e 1 amostra de peixe inteiro) mostraram a presença de *Salmonella enterica* e, portanto, estavam impróprias para o consumo. Essas amostras foram confirmadas pela detecção do gene *invA* na análise molecular. Todas as amostras gelo de manutenção do pescado estavam impróprias para o uso devido a presença de coliformes totais. E como agravante das seis amostras de gelo analisadas, quatro amostras tiveram enumeração de coliformes termotolerantes, sendo possível isolar *E. coli* dessas amostras que foram confirmadas na análise molecular através da amplificação do gene *MalB*. De acordo com a legislação brasileira, os coliformes totais e coliformes termotolerantes devem estar ausentes em 100 mL de água do gelo, para garantir os critérios de potabilidade do mesmo. O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas de *Salmonella enterica* isoladas das amostras de tilápia fresca, mostrou que do total de 21 cepas isoladas, 95,2% das cepas foram resistentes à associação de Amoxicilina com ácido clavulânico e a Tetraciclina (95,2%) e houve elevado índice de resistência a Sulfonamida (90,5%).

Todas as cepas testadas (100%) apresentaram resistência a pelo menos 2 dos antimicrobianos testados. E a maioria das cepas (19 cepas, 90,5%) apresentou perfil de multirresistência antimicrobiana. Conclui-se nesse estudo que a tilápia fresca comercializada no Distrito Federal e o gelo utilizado na sua conservação carecem de qualidade microbiológica e podem oferecer risco a saúde do consumidor pela possibilidade da veiculação de microrganismos patogênicos causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos.

Palavras-chave: pescado, *Salmonella enterica*, gelo, *Escherichia coli*, PCR, resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

Considering that tilapia is the most cultivated and consumed freshwater fish in Brazil, the objective of the present study was to evaluate the microbiological quality of fresh tilapia samples commercialized in the Federal District and to evaluate the quality of the ice used in its conservation. The results showed that four samples (3 fillet samples and 1 whole fish sample) of the six fresh tilapia samples analyzed (4 fillet samples and 2 whole fish samples) showed the presence of *Salmonella enterica* and, therefore, were unfit for consumption. These samples were confirmed by detection of the *invA* gene in molecular analysis. All fish keeping ice samples were unfit for use due to the presence of total coliforms. And as an aggravating factor of the six ice samples analyzed, four samples had enumeration of thermotolerant coliforms, and it was possible to isolate *E. coli* from these samples that were confirmed in the molecular analysis through the amplification of the *MalB* gene. According to Brazilian legislation, total coliforms and thermotolerant coliforms must be absent in 100 mL of ice water, to guarantee the criteria for its potability. The antimicrobial susceptibility profile of *Salmonella enterica* strains isolated from fresh tilapia samples showed that of the total of 21 strains isolated, 95.2% of the strains were resistant to the combination of Amoxicillin with clavulanic acid and Tetracycline (95.2%) and there was a high resistance index to Sulfonamide (90.5%). All strains tested (100%) showed resistance to at least 2 of the tested antimicrobials. And most of the strains (19 strains, 90.5%) showed antimicrobial multiresistance profile. It is concluded in this study that fresh tilapia marketed in the Federal District and the ice used in its conservation lack microbiological quality and

may pose a risk to the consumer's health due to the possibility of the transmission of pathogenic microorganisms that cause Foodborne Diseases.

Keywords: fish, *Salmonella enterica*, ice, *Escherichia coli*, PCR, antimicrobial resistance

INTRODUÇÃO

O consumo do pescado tem crescido vertiginosamente nas últimas décadas em todo o mundo, destacando-se como importante fonte alimentícia. Seu crescente consumo se deve aos inúmeros benefícios que proporciona, sendo um alimento rico em proteínas, ácidos graxos do tipo ômega-3 e com baixo teor de gorduras, apresentando-se como um alimento saudável no aspecto nutricional (SARTORI & AMANCIO, 2012). No Brasil, a tilápia é o peixe mais cultivado e consumido em todo o território nacional e até 2030 o país poderá chegar a produção anual de aproximadamente 20 milhões de toneladas, assumindo um relevante papel no abastecimento do pescado mundial (SCHULTER & VIEIRA FILHO, 2017).

Apesar de sua importância nutricional, o pescado apresenta uma alta probabilidade de deterioração (SOARES & GONÇALVES, 2012), devido a elevada quantidade de água na sua constituição, ao pH próximo da neutralidade, alto teor de nutrientes, rápida ação de enzimas autolíticas (como proteases ácidas), dentre outros fatores intrínsecos e extrínsecos, que favorecem a proliferação microbiana (DE PAIVA SOARES et. al., 2014). Dessa forma a qualidade microbiológica do pescado irá depender primordialmente dos procedimentos utilizados desde o momento da captura, durante sua manipulação, processamento e armazenamento até a chegada ao consumidor (BARTOLOMEU, et. al., 2011).

Dentre os microrganismos veiculados pelo pescado, faz-se menção a dois grupos de bactérias: o primeiro, contendo as bactérias associadas ao ambiente aquático onde o pescado habita, particularmente os vírios (*Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*), *Listeria sp.*, *Clostridium botulinum* e outros, e o segundo grupo inclui as bactérias patogênicas, provenientes de contaminação como *Salmonella spp.*, *Shigella sp.*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, entre outros. Sendo assim o pescado se apresenta como um potencial causador de Doenças

Transmitidas por Alimentos, devido ao favorecimento da veiculação de microrganismos causadores de tais patologias (DOS SANTOS, 2010).

Outro fator importante que tem influência direta na qualidade do pescado é o gelo utilizado na conservação desse produto. Nos supermercados e peixarias, o pescado deve estar exposto totalmente envolvido no gelo. A utilização de baixas temperaturas para conservação se faz importante em todas as etapas de produção, evitando a rápida deterioração do pescado (DORTA et al., 2011; FERREIRA, et.al., 2016). A legislação brasileira determina que o gelo destinado para o consumo humano ou que venha a ter contato direto com alimentos deverá ser fabricado a partir de água potável (BRASIL, 2004). Apesar de não ser um meio de cultivo para o desenvolvimento de microrganismos, devido à escassez de nutrientes, o gelo se comporta como um potencial veiculador de contaminação ao pescado, se preparado com água contaminada (FERREIRA, et.al.,2016).

Assim, o presente estudo teve como objetivo a avaliação da qualidade microbiológica de amostras de tilápia comercializados no Distrito Federal, assim como, do gelo utilizado em sua conservação.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta, preparo das amostras e análises microbiológicas das tilápias

Para as análises microbiológicas, foram coletadas seis amostras de tilápia fresca (duas amostras de peixe inteiro e quatro amostras de filé) em quatro diferentes supermercados do Distrito Federal. As amostras foram adequadamente acondicionadas e conduzidas ao Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia (UNB/FCE), onde foram imediatamente analisadas. Todas as amostras foram analisadas em três repetições, ou seja, foram retiradas três alíquotas de cada embalagem e os resultados foram expressos como média em log de UFC/g ou NMP/g. Para o preparo das amostras, foram pesadas 25 g de cada amostra e diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v). O material foi homogeneizado, obtendo-se desta forma a primeira diluição (10^{-1}). A partir da primeira diluição obtiveram-se as demais diluições decimais (até 10^{-3}).

Para a contagem total de bactérias mesófilas e psicrófilas, as diluições de cada amostra foram semeadas, pelo método de superfície, em placas de Petri contendo o meio de cultivo Ágar Padrão para Contagem. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h para bactérias mesófilas e a 7°C ± 1°C por 7 dias para bactérias psicrófilas. Os resultados obtidos foram expressos em log UFC/g.

Para a determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes as amostras foram analisadas conforme a técnica de tubos múltiplos, iniciando-se com o teste presuntivo, que consiste na inoculação de cada diluição das amostras em caldo Lauril Sulfato Triptose. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 h. A positividade do teste caracterizou-se pela turvação do caldo com a produção de gás nos tubos de Durham. Alíquotas dos tubos positivos no teste presuntivo foram inoculadas, simultaneamente, em tubos de ensaio contendo caldo verde brilhante bile lactose a 2% (para a confirmação de coliformes totais) e caldo *Escherichia coli* (para a confirmação de coliformes termotolerantes). Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h para o teste de coliformes totais e em banho-maria a 45°C por 24 h para o teste de coliformes termotolerantes. Os resultados obtidos foram expressos em log NMP/g.

Para a contagem de *Staphylococcus aureus*, cada uma das diluições das amostras foi semeada, pelo método de superfície, em placas de Petri contendo o meio de cultivo Agar Sal Manitol. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. As colônias suspeitas de *S. aureus* foram reisoladas em tubos de Agar Sal Manitol e submetidas à coloração de gram.

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., a diluição 10⁻¹ das amostras foi incubada à 37°C por 24 h. Após a incubação, pipetou-se 1 ml das alíquotas do caldo de enriquecimento para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo seletivo tetracionato com iodo. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação, procedeu-se à técnica de isolamento, onde a partir de cada tubo, semearam-se placas de Petri contendo o meio de cultivo Ágar Salmonella Shigella (SS) e/ou Agar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD). As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. As colônias suspeitas de *Salmonella* spp. foram transferidas para tubos inclinados contendo o meio de cultivo Agar TSI (três açúcares e ferro). Os tubos de TSI que apresentaram reações típicas de *Salmonella* spp. foram novamente repicadas para os meios SS e/ou XLD e levados para a estufa a 37°C por 24 h. As colônias puras

isoladas do SS e/ou XLD com característica típica de *Salmonella* spp. foram repicadas nos meios bioquímicos LIA (Lysina Iron Agar) e FA (fenilalanina Agar) e incubadas na estufa bacteriológica entre 18-24 h.

Coleta, preparo das amostras e análises microbiológicas do gelo

Para as análises microbiológicas, as amostras de gelo foram deixadas em temperatura ambiente para derreter. Para a determinação do NMP de coliformes nas amostras de gelo, utilizou-se uma bateria de 15 tubos de ensaio contendo caldo Lauril Sulfato Triptose e tubos de Durham invertidos (teste presuntivo). Nos primeiros 5 tubos inoculou-se 10 mL da amostra de gelo derretido em cada tubo (diluição 1:1). Nos próximos 5 tubos, inoculou-se 1 mL da amostra de gelo derretido em cada tubo (diluição 1:10) e nos 5 últimos tubos inoculou-se 0,1 mL da amostra de gelo derretido em cada tubo (diluição 1:100). Os tubos foram incubados a 37°C durante 24 horas (FUNASA, 2006).

A positividade do teste caracterizou-se pela turvação do caldo com a produção de gás nos tubos de Durham. Alíquotas dos tubos positivos no teste presuntivo foram inoculadas em tubos de ensaio contendo caldo verde brilhante bile lactose a 2% (para a confirmação de coliformes totais) e caldo *Escherichia coli* (para a confirmação de coliformes termotolerantes). Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h para o teste de coliformes totais e em banho-maria a 45°C por 24 h para o teste de coliformes termotolerantes. Os resultados obtidos foram expressos em log NMP/100 mL.

Identificação molecular de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* e *Escherichia coli*

As bactérias isoladas suspeitas de serem *S. aureus*, *S. enterica* e *E. coli* foram identificadas através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para a identificação de *S. aureus* foi utilizado o fragmento de 401 pares de base referente ao gene *Sec*. Para a identificação de *S. enterica* foi utilizado o fragmento de 445 pares de base referente ao gene *invA*. E para a identificação de *E. coli* foi utilizado o

fragmento de 113 pares de base referente ao gene *MalB*. Os primers construídos para este estudo estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos primers e tamanho dos produtos amplificados na PCR para identificação dos genes *Sec*, *invA* e *MalB*

Primer	Sequência 5´- 3´	Produto amplificado	Espécie
<i>Sec</i> foward	TTTTACACCCAACGTATTAGCAGA	401 pb	<i>S. aureus</i>
<i>Sec</i> reverse	TCCCATTATCAAAGTGGTTTCC		
<i>invA</i> foward	GCTGATGCCGGTGAAATTAT	445 pb	<i>S. enterica</i>
<i>invA</i> reverse	CGACAAGACCATCACCAATG		
<i>MalB</i> foward	TCTATGGGCTGTGACTGCTG	113 pb	<i>E. coli</i>
<i>MalB</i> reverse	GGCATCCCCATGATGTAGTT		

As colônias isoladas suspeitas de serem *S. aureus*, *S. enterica* ou *E. coli* foram inoculadas, individualmente, em caldo Brain Heart Infusion e incubadas a 37°C por 18 h. A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo proposto no kit comercial Plasmid DNA purification MACHEREY-NAGEL®. A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram determinadas por eletroforese em gel de agarose, em comparação com o padrão de massa molecular DNAI/HindIII marcador de 100 pb (JENA®). Após a extração do DNA, a amplificação de fragmentos de genes foi realizada utilizando o termociclador Techne® modelo TC-512. As condições de termociclagem foram 50°C por 2 min., 95°C por 2 min. e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg., seguida de 60°C por 30 seg., para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 30 seg. para a extensão dos fragmentos. Foram utilizados 2,5 µL de tampão (10 mM de Tris e 50 mM de KCl), 0,7 µL de MgCl₂, 1,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µL de Taq-Polimerase (Cenbiot®, 5 U/µL), 1,5 µL de oligonucleotídeos foward e reverse (10 µM), completando com água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação, com a amplificação de 10 ng de DNA extraído da amostra bacteriana. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultra-violeta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100 pb DNAI/HindIII (JENA®).

Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das bactérias *Salmonella* isoladas das amostras de tilápia

A susceptibilidade das cepas de *Salmonella* aos antimicrobianos foi avaliada pela técnica de disco-difusão (método Kirby-Bauer), utilizando protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). Os antimicrobianos e as concentrações em microgramas testados foram: amoxicilina com ácido clavulânico (10 µg) (β-lactâmico/penicilina), ceftazidima (30 µg) (β-lactâmico/cefalosporina), cefotaxima (30 µg) (β-lactâmico/cefalosporina), gentamicina (10 µg) (aminoglicosídeo), cloranfenicol (30 µg) (fenicol), imipenem (10 µg) (β-lactâmico/carbapenem), tetraciclina (30 µg) (tetraciclina), ciprofloxacina (5 µg) (quinolona) e sulfonamida (300 µg) (sulfonamida) (NEWPROV®). As zonas de inibição foram medidas e classificadas como sensível e resistente de acordo com recomendações do CLSI (2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram analisadas seis amostras de tilápia fresca e seis amostras do gelo em que as mesmas se encontravam em conservação. Os resultados das análises microbiológicas realizadas nas amostras de tilápia fresca estão listados na Tabela 2.

As bactérias mesófilas indicam a qualidade sanitária dos alimentos e mesmo quando não se encontram microrganismos patogênicos na amostra, seu número elevado é indicativo de que o alimento está insalubre. Segundo a International Commission on Microbiological Specifications for Foods, a quantificação dessas bactérias indica a qualidade higiênicosanitária, a vida útil e indiretamente se o controle da temperatura, transporte, armazenamento estão sendo realizados de maneira correta (ICMS, 1984).

No que diz respeito as bactérias psicotróficas, estas são caracterizadas como sendo aquelas que quando submetidas as condições de refrigeração continuam a se multiplicar, ou seja em temperaturas abaixo de 7°C, embora a temperatura ótima de crescimento se situe entre 20 e 30°C (FRANCO & LANDGRAF, 2008; SANTOS et. al.,

2009). Essas bactérias participam diretamente do processo de deterioração do pescado por se multiplicarem bem em ambiente refrigerado, dessa forma utilizam o peixe como substrato para realização de suas atividades metabólicas, sintetizando substâncias que conferem aroma e sabor desagradável ao alimento, diminuindo a vida de prateleira do produto (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Tabela 2. Análises microbiológicas das amostras de tilápia fresca

Amostras de tilápia	Bactérias mesófilas (log UFC/g)	Bactérias psicrotróficas (log UFC/g)	Coliformes totais (log NMP/g)	Coliformes termotolerantes (log NMP/g)	<i>S. aureus</i> (log UFC/g)	<i>Salmonella enterica</i>
1 *PE	4,80±0,11	3,63±0,11	0,76±0,17	ND	2,69±0,65	Presença
2 *PC	ND	2,89±0,19	1,62±0,26	0,92±0,61	1,53***	Ausência
3 **FTC	4,28±0,12	4,90±0,19	2,53±0,45	0,79±0,24	1,53***	Presença
4 **FTPA	6,21±0,01	5,83±0,15	1,91±0,65	ND	2,26***	Ausência
5 **FTE	6,29±0,02	5,59±0,38	1,76±0,26	0,56***	2,00***	Presença
6**FTO	6,08±0,58	4,18±0,17	0,63±0,20	ND	1,77***	Presença

* peixe inteiro; **filé de tilápia, *** = não foi possível calcular o desvio padrão, pois apenas uma bateria de tubos ou uma placa apresentou resultados positivos; ND = não detectado; os resultados foram expressos como média de análises em triplicata ± desvio padrão.

A Resolução RDC n. 12/2001 (BRASIL, 2001) em vigor não estabelece valores para a contagem de bactérias mesófilas e psicrotróficas para pescado *in natura*, porém, de acordo com a International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 1986), a contagem de microrganismos mesófilos e psicrotróficos máxima deve ser de 7 log UFC/g para os alimentos em geral, estando o pescado incluso em tal parâmetro. Sendo assim, no presente estudo tanto para a contagem de bactérias mesófilas (4,28 a 6,29 log UFC/g) como para bactérias psicrotróficas (2,89 a 5,83 log UFC/g), as amostras de tilápia fresca (peixe inteiro e filé), se encontraram dentro dos limites permitidos para o consumo.

Em um estudo realizado por SILVA et. al (2016), que buscou verificar a qualidade higiênicossanitária da tilápia comercializada em mercados públicos do

município de Mossoró, Rio Grande do Norte, obteve-se um resultado similar em relação à contagem de bactérias psicrotróficas, já que os resultados variaram de 4,71 a 5,40 log UFC/g. Em um outro estudo, SANTOS & COELHO (2016) avaliaram a qualidade microbiológica de pescados comercializados em feiras livres de Palmas, Tocantins, verificando que as contagens de bactérias mesófilas foram de no máximo de 6,43 log UFC/g, enquanto as contagens de bactérias psicrotróficas apresentaram valor máximo de 6,81 log UFC/g, indicando qualidade microbiológica satisfatória em todas as amostras analisadas.

A legislação brasileira também não estabelece valores para coliformes totais e termotolerantes no pescado fresco. Para coliformes a 45°C, há valores preconizados pela International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 1986) de máximo de 3 log NMP/g. Diante dos valores apresentados para esse parâmetro microbiológico, na Tabela 2 verificou-se que não houve nenhuma amostra acima do valor máximo estabelecido pela ICMSF. Apesar do baixo número de coliformes termotolerantes em três amostras de tilápia das seis amostras analisadas, bactérias *E. coli* foram isoladas e confirmadas por identificação molecular através da amplificação de gene *MalB* em duas amostras de tilápia, conforme descrito na Tabela 3.

No estudo realizado por REBOUÇAS et al. (2017), observou-se resultados semelhantes aos apontados no presente trabalho, já que todas as amostras analisadas estiveram dentro dos limites propostos pela ICMSF para Coliformes, sendo que nenhuma apresentou confirmação para Coliformes Termotolerantes e conseqüentemente para *E. coli*. Entretanto BARRETO et al. (2012), em uma análise do pescado comercializado em Cruz das Almas, Bahia, constataram elevada presença de coliformes totais em 91% das amostras analisadas e para os coliformes termotolerantes, algumas amostras apresentaram 4,04 log NMP/g e portanto estavam impróprias para o consumo.

Para *S. aureus*, o presente estudo detectou a sua presença em todas as amostras de tilápia analisadas, mas em valores abaixo do preconizado pela legislação brasileira, uma vez que esta estabelece um valor máximo de 3 log UFC/g no pescado fresco (BRASIL, 2001). Somente uma amostra de peixe inteiro mostrou um valor mais elevado (2,69 log UFC/g) para *S. aureus*. Apesar das baixas contagens de estafilococos nas amostras de tilápia deste estudo, bactérias *S. aureus* foram isoladas

e confirmadas por identificação molecular através da amplificação de gene *Sec* em quatro amostras de tilápia, conforme descrito na Tabela 3.

No estudo de SOUSA et al. (2017), detectaram-se algumas amostras de tilápia com contagens de *S. aureus* superior ao permitido pela legislação brasileira no pescado, denotando a falta de condições higiênico-sanitárias, já que o manipulador é o principal responsável por essa contaminação.

Já o gênero *Salmonella*, um bastonete Gram-negativo da família *Enterobacteriaceae*, é dividido em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A primeira é subdividida em seis subespécies que são divididas em diversos sorotipos, sendo que 99,5% dos sorotipos isolados com frequência pertencem à subespécie *enterica* (MOREIRA, 2012). É um patógeno de ampla distribuição, sendo os alimentos o meio mais comum de transmissão, sua ocorrência vai desde países subdesenvolvidos até as grandes potências mundiais (OLIVEIRA et al., 2013). De acordo com a legislação brasileira, a *Salmonella* deve estar ausente em pescados "in natura", resfriados ou congelados (BRASIL, 2001).

Neste estudo, diante das análises realizadas, do total de seis amostras de tilápia fresca (4 amostras de filé e 2 amostras de peixe inteiro), quatro amostras (3 amostras de filé e 1 amostra de peixe inteiro) mostraram a presença de *Salmonella enterica* e, portanto, estavam impróprias para o consumo. Essas amostras foram confirmadas pela detecção do gene *invA* na análise molecular (Tabela 3).

Um estudo realizado por COSTA (2016) com amostras de tilápia coletadas de um pesque-pague no estado de São Paulo, demonstrou que das 36 amostras analisadas, 21 positivaram para *Salmonella* spp., sendo que 11 amostras eram de filés e 10 eram de peixes inteiros. Em um outro estudo, ARAÚJO (2015), averiguou que das 8 amostras de tilápia frescas coletadas nos supermercados do Distrito Federal, em 5 amostras detectou-se a presença de *Salmonella* spp. Assim, em ambos os estudos mais de 50% das amostras se encontravam inapropriadas para o consumo segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2001). Tais resultados que se assemelham ao nosso estudo são alarmantes já que a *Salmonella* spp. está associada a má qualidade higiênica do pescado por indicar a condição da água no local de captura, uma vez que se encontra no trato intestinal de diversos animais (COSTA, 2016).

As bactérias do gênero *Salmonella* spp. podem ser encontradas em peixes através de diversas formas de contaminação, porém as patologias que elas provocam

nesses animais ainda é desconhecida (FERNANDES et. al., 2018). Apesar disso, o que se sabe é que bactérias desse gênero são perigosas à saúde humana, principalmente a *Salmonella enterica* que causa significativa morbimortalidade no mundo, sendo seus sorovares um grupo diversificado de patógenos que se adaptaram a uma grande variedade de ambientes e hospedeiros (DE SOUZA GAZAL et. al., 2018).

Tabela 3. Análises moleculares das amostras de tilápia fresca

Amostra	Bactéria e gene amplificado na PCR		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>
1 *PE	Sec	-	<i>invA</i>
2 *PC	Sec	<i>MalB</i>	-
3 **FTC	-	-	<i>invA</i>
4 **FTPA	Sec	-	-
5 **FTE	-	<i>MalB</i>	<i>invA</i>
6 **FTO	Sec	-	<i>invA</i>

* peixe inteiro; **filé de tilápia

. Os resultados das análises microbiológicas realizadas nas amostras de gelo de conservação do pescado estão listados na Tabela 4. De acordo com a legislação (BRASIL, 2004), os coliformes totais e coliformes termotolerantes devem estar ausentes em 100 mL de água do gelo, para garantir os critérios de potabilidade do mesmo, o que significa que neste estudo todas as amostras gelo de manutenção do pescado estavam impróprias para o uso, pela presença de coliformes totais. E como agravante das seis amostras de gelo analisadas, quatro amostras tiveram enumeração de coliformes termotolerantes, sendo possível isolar *E. coli* dessas amostras que foram confirmadas na análise molecular através da amplificação do gene *MalB*.

Tabela 4. Análises microbiológicas das amostras de gelo

Amostras de gelo	Coliformes totais (log NMP/100ml)	Coliformes termotolerantes (log NMP/100ml)	Confirmação de <i>E. coli</i> na PCR
1	1,24	0,60	<i>MalB</i>
2	1,25	0,95	<i>MalB</i>
3	1,52	1,32	<i>MalB</i>
4	0,60	ND	-
5	3,20	2,45	<i>MalB</i>
6	0,84	ND	-

ND = não detectado

A análise realizada por FERREIRA et. al (2016), apresenta similaridade com os resultados do presente trabalho, evidenciando que 75% das amostras apresentaram contaminação por coliformes totais e termotolerantes. Outros estudos também constataram a presença de coliformes no gelo. No trabalho de GIAMPIETRO & REZENDE-LAGO (2009), ao avaliarem amostras do gelo em quatro diferentes estabelecimentos comerciais de Ribeirão Preto (SP), verificou-se que 29 amostras (96,7%) estavam contaminadas por coliformes totais e 22 amostras (73,3%) por coliformes termotolerantes. No estudo de DORTA et al. (2011) identificaram coliformes totais e *E. coli* em todas as amostras de gelo provenientes de fábricas da cidade de Teresina. Indicando como um potencial veículo de contaminação por *E. coli* as amostras de gelo analisadas no presente estudo.

A Tabela 5 apresenta o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas de *Salmonella enterica* isoladas das amostras de tilápia fresca. Das quatro amostras de tilápia que apresentaram *Salmonella* foi possível isolar e identificar 21 cepas características de *Salmonella* e essas cepas foram submetidas ao teste de antibiograma pela técnica de disco-difusão (método Kirby-Bauer). Do total de 21 cepas, 95,2% das cepas foram resistentes à associação de Amoxicilina com ácido clavulânico e a Tetraciclina (95,2%) e houve elevado índice de resistência a Sulfonamida (90,5%). Verificou-se a presença de cepas intermediárias em quase todos os antimicrobianos testados, com exceção da Tetraciclina, sugerindo a presença de cepas mutantes, fenômeno este de origem espontânea (UFJF, 2018).

Tabela 5. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias *Salmonella enterica* isoladas das amostras de tilápia fresca

Antibióticos	S n (%)	I n (%)	R n (%)	HALO S (mm)	HALO I (mm)	HALO R (mm)
Amoxicilina	1 (4,8%)	-	20 (95,2%)	>18	-	< 18
Sulfonamida	0,0%	2 (9,5%)	18 (90,5%)	>17	12-17	< 12
Gentamicina	10 (47,6%)	10 (47,6%)	1 (4,8%)	>15	12-15	< 12
Tetraciclina	1 (4,8%)	0,0%	20 (95,2%)	>21	17-21	< 17
Cloranfenicol	7 (33,3%)	10 (47,7%)	4 (19,0%)	>18	12-18	< 12
Ciprofloxacina	14 (66,7%)	5 (23,8%)	2 (9,5%)	>21	15-21	< 15
Imipenem	1 (4,8%)	15 (71,4%)	5 (23,8%)	>23	19-23	< 19
Ceftazidima	1 (4,8%)	21 (71,4%)	5 (23,8%)	>26	22-26	< 22
Cefotaxima	13 (61,9%)	5 (23,8%)	3 (14,3%)	>21	17-21	< 17

S = sensível; I = intermediário; R = resistente; n = número de cepas; % = porcentagem em relação ao total de 21 cepas.

O perfil de resistência da *Salmonella* spp. varia consideravelmente nos estudos reportados na literatura. FARIAS (2013) reportou que as 17 cepas de *Salmonella* isoladas de pescado analisadas foram sensíveis aos antimicrobianos ceftazidima e cloranfenicol. Nesse estudo, a maioria das cepas se classificaram como intermediárias para os antimicrobianos ceftazidima e cloranfenicol. Já no trabalho de SOUZA, et. al. (2010) as 44 amostras de *Salmonella* Typhi avaliadas mostraram-se mais sensíveis e observou-se que todas as amostras apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos: ampicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, ceftazidima, gentamicina e sulfametoxazol + trimetropim.

Nesse estudo, todas cepas testadas (100%) apresentaram resistência a pelo menos 2 dos antimicrobianos testados (Tabela 6). E a maioria das cepas (19 cepas, 90,5%) apresentou um perfil de multirresistência antimicrobiana. Uma bactéria é considerada multirresistente quando apresenta resistência a 3 ou mais antimicrobianos pertencentes a classes diferentes (MAGIORAKOS et al., 2012)

Tabela 6. Número de cepas de *Salmonella enterica* isoladas das amostras de tilápia fresca com resistência aos antimicrobianos testados

Número de cepas	Cepas (%) [*]	Números de antimicrobianos aos quais as cepas apresentaram resistência
2	9,5	2
8	38,1	3
8	38,1	4
2	9,5	6
1	4,8	7
21	100	Total

* % = porcentagem em relação ao total de 21 cepas

* Número de antimicrobianos aos quais as cepas apresentaram resistência; Número de cepas (%)** = número de cepas com perfil de resistência e porcentagem em relação ao total de 21 cepas

Um aspecto importante que se destaca no cenário global é a preocupação com a resistência bacteriana aos agentes terapêuticos antimicrobianos, já que avança em um ritmo considerável. Vários fatores têm favorecido para o desenvolvimento dessa resistência, como o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos tanto na medicina, como na agropecuária. Espera-se que sejam elaboradas estratégias eficazes de combate a esse avanço, com uma gestão de risco apropriada, como também o monitoramento e compreensão dos mecanismos de adaptação das bactérias aos agentes já existentes e aos que vierem a ser introduzidos na terapêutica, visando evitar falhas no tratamento de infecções, assim como ao aumento dessa resistência (MOREIRA, et.al., 2013).

CONCLUSÃO

Este estudo avaliou a qualidade microbiológica de amostras de tilápia fresca comercializadas no Distrito Federal e do gelo utilizado na sua conservação. Do total de seis amostras de tilápia fresca analisadas, quatro amostras mostraram a presença de *Salmonella enterica* e, portanto, estavam impróprias para o consumo. Essas amostras foram confirmadas pela detecção do gene *invA* na análise molecular. A presença de *Salmonella* spp. está associada a má qualidade higiênica do pescado por indicar a condição da água no local de captura, uma vez que se encontra no trato intestinal de diversos animais de sangue quente.

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas de *Salmonella enterica* isoladas das amostras de tilápia fresca, mostrou que do total de 21 cepas isoladas, 95,2% das cepas foram resistentes à associação de Amoxicilina com ácido clavulânico e a Tetraciclina (95,2%) e houve elevado índice de resistência a Sulfonamida (90,5%). Todas as cepas testadas (100%) apresentaram resistência a pelo menos 2 dos antimicrobianos testados. E a maioria das cepas (19 cepas, 90,5%) apresentou perfil de multirresistência antimicrobiana. O aumento no isolamento de cepas de *Salmonella* spp. resistentes a antibióticos têm sido associado ao uso indiscriminado de antimicrobianos em animais de produção. Esse fato representa um risco para a saúde pública pela possibilidade de transferência de cepas resistentes de *Salmonella* spp. aos humanos em função do consumo de alimentos contaminados.

Todas as amostras gelo de manutenção do pescado estavam impróprias para o uso, pela presença de coliformes totais. E como agravante das seis amostras de gelo analisadas, quatro amostras tiveram enumeração de coliformes termotolerantes, sendo possível isolar *E. coli* dessas amostras que foram confirmadas na análise molecular através da amplificação do gene *MalB*. A presença de *E. coli* nas amostras de gelo é preocupante, pois indica que a água utilizada para o seu preparo teve contato direto ou indireto com contaminação fecal, evidenciando a má qualidade da matéria prima utilizada ou falhas durante o processo de elaboração do produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO

ARAÚJO, Y. F. Avaliação da qualidade da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) fresca e resfriada e do gelo de manutenção comercializados na cidade de Brasília. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Brasília, 2015. Disponível em: <http://bdm.unb.br/handle/10483/10959>.

BARRETO, Norma Suely Evangelista et al. Avaliação das condições higiênico-sanitárias do pescado comercializado no município de Cruz das Almas, Bahia. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 3, p. 86-95, 2012.

BARTOLOMEU, Dayse Aline Ferreira Silva et al. Contaminação microbiológica durante as etapas de processamento de filé de tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Archives of veterinary Science**, v. 16, n. 1, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde, Portaria n. 518 de 25 de março de 2004. **Procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004.

BRASIL, ANVISA, Resolução Nº12 de 02 de janeiro de 2001. **Aprova padrões microbiológicos para alimentos**. Disponível em: www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01_rde.htm.

CARDOSO FILHO, F.C.; BRAGA, J.F.V.; MURATORI, M.C.S. Aspecto higiênicos sanitários de peixes comercializados em mercados públicos de Teresina, PI. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.24, n.183, p. 116-120, 2010.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement**. CLSI M100-S23, Wayne.

COSTA, Thayssa Duarte. Qualidade microbiológica e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados de tilápias (*Oreochromis* spp.) de pesque-pague da microrregião do Estado de São Paulo. 2016.

DE PAIVA SOARES, Karoline Mikaelle; GONÇALVES, Alex Augusto; BARBOSA DE SOUZA, Lara. Qualidade microbiológica de filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante o armazenamento em gelo. **Ciência Rural**, v. 44, n. 12, 2014.

DE SOUZA GAZAL, L.E. et al. *Salmonella* sp. em peixes – qual a importância para sanidade em pescado? **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v.24, ns.1/2, p. 55-64, 2018.

DORTA, V. F.; MURATORI, M. C. S.; ALMEIDA, C. K. S.; CARDOSO FILHO, F. C. Condições higiênico-sanitárias do gelo utilizado para conservação do pescado nos mercados de Teresina, PI. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.25, n.196/197, p.124-128, 2011.

DOS SANTOS, Carlos Alberto Muylaert Lima. Doenças transmitidas por pescado no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 32, n. 4, p. 234-241, 2010.

FARIAS, Antonio Pedro Fróes de. Suscetibilidade antimicrobiana de *Salmonella* spp. isoladas de moluscos bivalves no município de São Francisco do Conde, Bahia. 2013.

FERNANDES, D. V. G. S.; CASTRO, V. S.; CUNHA NETO, A.; FIGUEIREDO, E. E. S. *Salmonella* spp. in the fish production chain: a review. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 48, n. 8, p. 1-11, e2018141, 2018.

FERREIRA, E. M. et al. Qualidade microbiológica do peixe serra (*Scomberomerus brasiliensis*) e do gelo utilizado na sua conservação. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 1, p. 49-54, 2014.

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

FUNASA, Fundação Nacional de Saúde. **Manual Prático de Análise de Água**, Brasília: Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde, 2006.

GIAMPIETRO, A.; REZENDE-LAGO, N.C.M. Qualidade do gelo utilizado na conservação de pescado fresco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n.3, p.505-508, 2009.

ICMSF. **Microorganismos de los alimentos: técnicas de análisis microbiológico**. Zaragoza: Acribia, 1984. 431p.

ICMSF. **Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications**. 2.ed. London: Blackwell Scientific Publications, 1986. 131p.

MOREIRA, N. M. Métodos de tipificação de *Salmonella* sp. Seminário apresentado junto à Disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Goiás, 2012.

MOREIRA, N.M., SOLA, M.C., FEISTEL, J.C., DE OLIVEIRA, J.J., DE FREITAS, F.A. Os mecanismos de resistência bacteriana da *Salmonella* sp, frente a utilização de antibióticos. **Enciclopédia Biosfera**, v.9, n.16, p. 1132, 2013.

OLIVEIRA, Aline Pedrosa et al. *Salmonella enterica*: genes de virulência e ilhas de patogenicidade. **Enciclopédia Biosfera**, v.9, n.16, p. 1947-1972. 2013.

REBOUÇAS, L.O.S. et al. Qualidade Física e Sensorial da Tilápia (*Oreochromis niloticus*) cultivada em ambiente de água doce e salgada. **Boletim Industria Animal**, v.74, n.2, p116-121, 2017.

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

SANTOS, Priscila Alonso dos et al. Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos em leite cru refrigerado coletado na macrorregião de Goiânia, GO. 2009.

SANTOS, D. D. M.; COELHO, A. F. S. Qualidade microbiológica de pescado comercializado em feiras livres de Palmas - TO. **Revista Higiene Alimentar**, v. 30, n. 262/263, p. 125-130, 2016.

SCHULTER, Eduardo Pickler; VIEIRA FILHO, José Eustáquio Ribeiro. Evolução da Piscicultura no Brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia. Texto para Discussão, 2017.

SILVA, Renata Xavier et al. Qualidade higiênicossanitária da tilápia (*Oreochromis* spp.) fresca e congelada em mercados públicos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n. 4, p. 574-580, 2016.

SOARES, K.M.P., GONÇALVES, A.A. Qualidade e segurança do pescado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 71, n. 1, p. 1-10. 2012.

SOUSA, Flaviana Antunes et al. Caracterização higiênicossanitária e tecnológica dos pescadores e da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) comercializada no mercado municipal de Salinas-MG. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 24, n. 4, 2017.

SOUZA, Cintya de Oliveira et al. Resistência antimicrobiana de *Salmonella typhi* identificadas no Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 61-65, 2010.

UFJF. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA - estudo *in vitro* da susceptibilidade bacteriana à ação das drogas antimicrobianas, 2018. Roteiro para aulas práticas. Disponível em: <http://www.ufjf.br/microbiologia/files/2018/04/ROTEIRO-PARA-AULAS-PR%C3%81TICAS-bacteriologia-2018-parte-06-Antibiograma.pdf>

VIANA, Indyara Cássya Luysa do Amaral et al. Análise microbiológica do tabaqui (*Colossoma macropomum*) comercializado na feira municipal de Ariquemes, Estado de Rondônia, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. 2, p. 67-73, 2016.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA

ATIQUE, T. S. C. et al. Sensibilidade à metilina/oxacilina de *Staphylococcus aureus* isolados da mucosa nasal de alunos do Centro Universitário de Rio Preto. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 3, p. 347-352, 2012.

BAPTISTA, Maria Galvão de Figueiredo Mendes et al. **Mecanismos de resistência aos antibióticos**. 2013. Dissertação de Mestrado.

BrCAST. Teste sensibilidade aos antimicrobianos Método de disco-difusão EUCAST. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. v. 6. 2017. Disponível em: http://brcast.org.br/download/vers%C3%B5es_antteriores/Manual-Disco-Difusa%CC%83o-BrCAST-03-2017.pdf

BARBOSA, Mayhara Martins Cordeiro. Qualidade higiênico-sanitária e ocorrência de *Aeromonas sp.* e *Escherichia coli* em tilápias comercializadas no varejo. 2013.

BRASIL. 1997. Ministério da Saúde. Portaria SVS/MS n. 326 de 30 de julho de 1997. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 ago. 1997.

BRASIL. 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.62, 18 de setembro de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União, de 18 de setembro de 2003. Seção I, p.14.

BRASIL. 2004. Ministério da Saúde. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para

consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Portaria n.518, de 25 de março de 2004. Diário Oficial da União, de 26 de março de 2004. Seção I, p.266.

BRASIL. 2008. Teste de Sensibilidade aos antimicrobianos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2008. Disponível em: http://anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/e_test.htm.

BOXSTAEL, S. V. et al. Comparison of antimicrobial resistance patterns and phage types of *Salmonella* Typhimurium isolated from pigs, pork in Belgium between 2001 and 2006. **Food Research International**, v. 45, p. 913-918, 2012.

CAMPOS, D. S.; PAIVA, Z. C. Condição higiênico-sanitária do pescado comercializado em feira no município de Manaus-AM. **Cadernos de Pós-Graduação da FAZU**, v. 2, p.1-7, 2012.

CARDOZO, M. V. Detecção de *Escherichia coli* shigatoxigênica (STEC) e enteropatogênica (EPEC) em peixes de pisciculturas e de vida livre. Repositório Unesp, 2014. Tese de Doutorado. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/122015>

CHEN, Z. B, WANG, M. L, BARKLEY, N. A., PITTMAN, R. N. A simple allele-specific PCR assay for detecting *FAD2* alleles in both A and B genomes of the cultivated peanut for high-oleate trait selection. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 28, p. 542–548, 2010.

DARWIN FUTURO, Coliformes Totais. 2009. Disponível em: http://darwin.futuro.usp.br/site/ecologia/quadroteorico/c_coliformes.htm Acesso em: 01 de abril de 2019.

DA SILVA, K. C. Monitoramento dos mecanismos de resistência em *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isoladas de animais de produção agropecuária e alimentos

derivados. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP, 2011. Tese de Doutorado. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-13022012-082940/en.php>.

DE MEDEIROS, N. X. de et al. Detecção molecular de *Salmonella* sp. em amostras avícolas. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações UFG, 2013. Dissertação de Mestrado. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/5217>

DO NASCIMENTO, Fernanda Maria Santos. Aplicação da técnica PCR para detecção de bactérias potencialmente patogênicas em um sistema UASB-lagoas de polimento para tratamento de esgoto doméstico. 2008.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Pesca e aquicultura. Palmas: Embrapa, 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/tema-pesca-e-aquicultura/>. Acesso em: abr. 2019.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Mercado da Tilápia – 2o trimestre de 2016. Palmas: Embrapa, 2016. (Informativo Mercado da Tilápia, n. 8). Disponível em: <https://www.embrapa.br/pesca-e-aquicultura/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1051014/o-mercado-da-tilapia---2-trimestre-de-2016>.

ESTRELA, Tatiana Silva. Saúde e Política externa: os 20 anos da Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde (1998-2018). Ministério da Saúde, Brasília, 2018. FAO. Fisheries Department. State of World aquaculture, 2006. FAP Fisheries Technical Paper. Rome: FAO; 2006.

FDA (Food & Drug Administration) (2011). Scombrototoxin (histamine) formation. Fish and Fisheries products hazard & control guides. Disponível: <http://www.fda.gov/.../fishandfisheriesproductshazardsandcontrolsguide/Chapt7>. Acesso em: abril de 2019.

FERNANDES, Dandara Virginia Guia Semedo et al. *Salmonella* spp. in the fish production chain: a review. **Ciência Rural**, v. 48, n. 8, 2018.

FIB. Microorganismos causadores de doenças de origem alimentar. **Food Ingredients Brasil**, v. 19, p. 51-59, 2011.

FIGUEIREDO, Carlos Alberto Junior; VALENTE, Airton Saboya Junior. Cultivo de tilápia no Brasil: origens e cenário atual. 2008.

FRANÇA, M. S. S. **Resistência bacteriana em bacilos Gram-negativos: a importância dos testes fenotípicos**. Biblioteca Digital de Monografias UFRN, 2017. Trabalho de Conclusão de Curso. Disponível em: <https://monografias.ufrn.br/jspui/handle/123456789/5826>

GANDRA, E. A. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GATTI JÚNIOR, Pedro. Qualidade Higiênica e sanitária de tilápias provenientes de cultivo, comercializadas no varejo. 2011.

GONÇALVES, Alex Augusto; DO PESCADO, Tecnologia. Ciência, tecnologia, inovação e legislação. 2011.

GONÇALVES, J. S. et al. Detecção de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* através de técnica PCR. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 17, n. 4, p. 223-226, 2014.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2015. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home>

JÚNIOR, C. A. F.; JÚNIOR, A. S. V. Cultivo de tilápia no Brasil: origens e cenário atual. Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Fortaleza, Ceará, 2008. Anais de evento. Disponível em: <https://ageconsearch.umn.edu/bitstream/108143/2/178.pdf>

MICHAEL, G. B. et al. Emerging issues in antimicrobial resistance of bacteria from food-producing animals. **Future Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 427-443, 2015.

MOREIRA, N. M. Métodos de tipificação de Salmonella sp. Seminário apresentado junto à Disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Goiás, 2012.

MOREIRA, N.M., SOLA, M.C., FEISTEL, J.C., DE OLIVEIRA, J.J., DE FREITAS, F.A. Os mecanismos de resistência bacteriana da Salmonella sp, frente a utilização de antibióticos. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, N.16; p. 1132, 2013.

MULLIS, K.B.; F.A. FALOONA. Recombinant DNA - Part F. In: A polymerase catalyzed chain reaction, p. 335-350. San Diego: Academic Press, 1987.

NESSE, L. L. et al. Molecular analyses of Salmonella enterica isolates from fish feed factories and fish feed ingredients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 1075-1081, 2003.

OETTERER, M.; SAVAY-DA-SILVA, L. K.; GALVÃO, J. A.; Uso do gelo é peça-chave na conservação do pescado. **Visão Agrícola**. São Paulo, v.11. p.134-136, 2012.

OLIVEIRA, T. M. S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. Repositório Institucional da Universidade de Aveiro, 2010. Dissertação de Mestrado. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10773/7230>

PEIXE, B. R. Anuário Peixe BR da piscicultura 2018. **São Paulo: Associação Brasileira de Piscicultura**, 2018.

PEREIRA, D. S.; JULIÃO, L.; SUCASAS, L. F. A. et al. **Boas práticas para manipuladores de pescado: o pescado e o uso do frio**. Piracicaba: ESALQ – Divisão de Biblioteca e Documentação, 2009. 36 p. Série Produtor Rural, n. 46.

PIRES, P. H. V. Relatório do estudo de viabilidade técnica e econômica da criação de peixes em tanques-rede na represa da Usina de Corumbá IV situada em Santo Antônio do Descoberto-Goiás. Biblioteca Digital da Produção Intelectual Discente da Universidade de Brasília, 2014. Relatório de Estágio. Disponível em: <http://bdm.unb.br/handle/10483/7932>

PIZAIA, M. G. et al. A piscicultura no Brasil: um estudo sobre a produção e comercialização de "*Oreochromis niloticus*". **Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural (SOBER)**. Anais de evento, 2008. Disponível em: <http://www.sober.org.br/palestra/9/497.pdf>

POSTOLLEC, F. et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 848-861, 2011.

ROCHA, Francisco Angelo Gurgel et al. Estafilococos coagulase positivos em filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*) comercializados no mercado modelo Nerival Araújo, Currais Novos/RN. **Holos**, v. 1, p. 84-91, 2013.

RODLOFF, Arne et al. Susceptible, intermediate, and resistant—the intensity of antibiotic action. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 105, n. 39, p. 657-662, 2008.

SANTIAGO, J. A. S. et al. Bactérias patogênicas relacionadas à ingestão de pescados-revisão. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 46, n. 2, p. 92-103, 2013.

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

SCHERER, R. et al. Efeito do gelo clorado sobre parâmetros químicos e microbiológicos da carne de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 680-684, 2004.

SCHULTER, Eduardo Pickler; VIEIRA FILHO, José Eustáquio Ribeiro. Evolução da Piscicultura no Brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia. Texto para Discussão, 2017.

SEBRAE, SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESA. Aquicultura no Brasil: série de estudos mercadológicos. Brasília, 2015.

SES-SP, SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO. Doenças Transmitidas por Água e Alimentos. Informe NET-DTA, 2013. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-devigilancia/doencas-transmitidas-por-agua-e-alimentos/doc/bacterias/201316staphylo.pdf>

SILVA, Moisés Oliveira; AQUINO, Simone. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 8, n. 4, p. 472-482, 2018.

SILVA, Krislanne Coelho Viana da. Elaboração de projeto de implantação da tilapicultura: estudo de caso em uma propriedade do Núcleo Rural de Sobradinho I. 2014.

SIMÕES, Marcia Regina et al. Composição físico-química, microbiológica e rendimento do filé de tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, 2007.

SOARES, K.M.P., GONÇALVES, A.A., Qualidade e segurança do pescado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 71, n. 1, p. 1-10. 2012.

SOARES, Vanessa Mendonça et al. Qualidade microbiológica de filés de peixe congelados distribuídos na cidade de Botucatu-SP. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, p. 85-88, 2011.

STOCCO, Claudia Walus et al. **Controle de qualidade microbiológico em frigorífico**. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

TAVARES, M.; GONÇALVES, A. A. **Aspectos físico-químicos do pescado**. Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação. São Paulo: Editora Atheneu, p. 10-20, 2011.

TUNON, G. I. L. et al. Resistência antimicrobiana de *Salmonella* sp. isolada de carne de frango resfriada comercializada em Aracaju, Sergipe. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 5, n. 52, p. 04-06, 2008.

VIEIRA, Vanessa. A ameaça das superbactérias. Microbiologia in foco. São Paulo: SBM. Ano 8. nº 31. p. 11-16. 2017.

VIEIRA, R. H. S. F.; SAKER-SAMPAIO, S. **Emprego de gelo nos barcos**. In: VIEIRA, R. H. S. F. Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática. São Paulo: Varela. 2004.

WHO. Antimicrobial Resistance. **World Health Organization**, 2018. Texto informativo. Disponível em: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/en/>

ANEXO 1. Antibiograma das bactérias *Salmonella enterica* isoladas das amostras de tilápia fresca

Antibióticos	Cepas isoladas (halo de inibição medido em mm)																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
SUL	16	12	SH	SH	SH	SH	SH	HC	SH	HC	HC	SH	SH	SH	SH	HC	SH	SH	SH	SH	SH
CTX	28	20	33	31	33	14	26	27	21	20	2.6	14	19	21	26	33	26	14	23	23	23
CLO	19	21	16	HC	30	12	SH	17	13	13	HC	6	17	16	17	23	26	12	19	12	20
GEN	15	16	17	16	17	14	17	16	16	18	13	20	15	11	14	17	15	14	15	12	14
AMC	SH	SH	SH	12	26	SH	SH	SH	SH	HC	HC	SH	SH	SH	SH	SH	7	SH	SH	8	SH
CIP	23	24	22	20	30	19	21	27	26	26	24	26	26	14	9	19	22	19	25	23	25
TET	15	12	SH	SH	HC	SH	SH	7	HC	SH	SH	HC	SH	HC	SH	23	SH	SH	SH	SH	SH
IMP	19	18	18	22	26	19	22	20	23	22	22	SH	20	SH	5	23	20	19	23	23	23
CAZ	20	23	22	25	27	22	23	22	24	22	24	26	21	10	12	23	18	22	22	22	26

SUL = sulfonamida, CTX = cefotaxima, CLO = cloranfenicol, GEN = gentamicina, AMC = amoxicilina com ácido clavulânico, CIP = ciprofloxacina, TET = tetraciclina, IMP = imipenem CAZ = ceftazidima; SH = sem halo de inibição, HC = halo com bactéria

ANEXO 2. NORMAS DE SUBMISSÃO PARA A REVISTA HIGIENE ALIMENTAR

01. As colaborações enviadas à Revista Higiene Alimentar na forma de artigos, pesquisas, comentários, revisões bibliográficas, notícias e informações de interesse para toda a área de alimentos, devem ser elaboradas utilizando *softwares* padrão IBM/PC (textos em *Word nas mais variadas versões do programa*; gráficos em *Winword, Power Point ou Excel*) ou *Page Maker 7*, ilustrações em *Corel Draw nas mais variadas versões do programa* (verificando para que todas as letras sejam convertidas para curvas) ou *Photo Shop*.

02. Os trabalhos devem ser digitados em caixa alta e baixa (letras maiúsculas e minúsculas), evitando títulos e/ou intertítulos totalmente em letras maiúsculas e em negrito. Tipo da fonte *Times New Roman*, ou similar, no tamanho 12.

03. Do trabalho deverão constar as seguintes partes: Título, Resumo, Palavras-chave, *Abstract*, keywords, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas. Os gráficos, tabelas e figuras devem fazer parte do corpo do texto e o tamanho total do trabalho deve ficar entre 6 e 9 laudas (aproximadamente 9 páginas em fonte TNR 12, com espaçamento entre linhas 1,5 e margens superior e esquerda 3 cm, inferior e direita 2 cm).

04. Resultados de pesquisas relacionados a seres humanos deverão ser apresentados acompanhados do número do parecer junto ao Comitê de Ética da instituição de origem ou outro relacionado ao Conselho Nacional de Saúde.

05. Do trabalho devem constar: o nome completo do autor e co-autores (respeitando o máximo de quatro), e-mail de todos (será publicado apenas o e-mail do primeiro autor, o qual responde pelo trabalho) e nome completo das instituições às quais pertencem, com três níveis hierárquicos (Universidade, Faculdade, Departamento), também a cidade, estado e país.

06. As referências bibliográficas devem obedecer às normas técnicas da ABNT-NBR-6023 e as citações conforme NBR 10520 sistema autor-data.

07. Para a garantia da qualidade da impressão, são indispensáveis as fotografias e originais das ilustrações a traço. Imagens digitalizadas deverão ser enviadas mantendo a resolução dos arquivos em, no mínimo, 300 pontos por polegada (300 dpi).

08. Será necessário que os colaboradores mantenham seus programas anti-vírus atualizados

09. Todas as informações são de responsabilidade do primeiro autor com o qual faremos os contatos, através de seu e-mail que será também o canal oficial para correspondência entre autores e leitores.

10. Juntamente com o envio do trabalho deverá ser encaminhada declaração garantindo que o trabalho é inédito e não foi apresentado em outro veículo de comunicação. Na mesma deverá constar que todos os autores estão de acordo com a publicação na Revista.

11. Não será permitida a inclusão ou exclusão de autores e co-autores após o envio do trabalho. Após o envio do trabalho, só será permitido realizar mudanças sugeridas pelo Conselho Editorial.

12. Os trabalhos deverão ser encaminhados exclusivamente *on-line*, ao e-mail autores@higienealimentar.com.br.

13. Recebido o trabalho pela Redação, será enviada **declaração de recebimento** ao primeiro autor, no prazo de dez dias úteis; caso isto não ocorra, comunicar-se com a redação através do e-mail autores@higienealimentar.com.br

14. As colaborações técnicas serão devidamente analisadas pelo Corpo Editorial da revista e, se aprovadas, será enviada ao primeiro autor declaração de aceite, via e-mail.

15. As matérias serão publicadas conforme ordem cronológica de chegada à

Redação. Os autores serão comunicados sobre eventuais sugestões e recomendações oferecidas pelos consultores.

16. Para a Redação viabilizar o processo de edição dos trabalhos, o Conselho Editorial solicita, a título de colaboração e como condição vital para manutenção econômica da publicação, que pelo menos um dos autores dos trabalhos enviados seja assinante da Revista. Neste caso, por ocasião da publicação, será cobrada uma taxa de R\$ 50,00 por página diagramada. Não havendo autor assinante, a taxa de publicação será de R\$ 70,00 por página diagramada.

17. Quaisquer dúvidas deverão ser imediatamente comunicadas à Redação através do *e-mail*

autores@higienealimentar.com.br