



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E SAÚDE
PÚBLICA NOS TRÓPICOS**

HELEN MARIEL BIAZUSSI

**INVESTIGAÇÃO DA QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA E SEGURANÇA
MICROBIOLÓGICA DE PESCADOS FRESCOS COMERCIALIZADOS NA
CIDADE DE ARAGUAÍNA-TO**

Araguaína-TO

2019

HELEN MARIEL BIAZUSSI

**INVESTIGAÇÃO DA QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA E SEGURANÇA
MICROBIOLÓGICA DE PESCADOS FRESCOS COMERCIALIZADOS NA
CIDADE DE ARAGUAÍNA - TO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Tocantins e aprovada em sua versão e forma final pela orientadora e banca examinadora para obtenção do título de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos.

Orientadora: Prof^a Dra. Bruna Alexandrino.

Coorientadora: Prof^a Dra. Silvia Minharro Barbosa.

Araguaína-TO

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

B579i BIAZUSSI, HELEN MARIEL.
INVESTIGAÇÃO DA QUALIDADE HIGIÊNICO SANITÁRIA E
SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE PESCADOS FRESCOS
COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE ARAGUAÍNA/TOCANTINS. /
HELEN MARIEL BIAZUSSI. – Araguaína, TO, 2019.
59 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins
– Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado)
em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2019.

Orientadora : Dra. Bruna Alexandrino

Cooorientadora : Dra. Sílvia Minharro Barbosa

1. Microbiologia de alimentos. 2. Peixes frescos. 3. Saúde Pública. 4. Feira
livre. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer
forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184
do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

HELEN MARIEL BIAZUSSI

**INVESTIGAÇÃO DA QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA E SEGURANÇA
MICROBIOLÓGICA DE PESCADOS FRESCOS COMERCIALIZADOS NA
CIDADE DE ARAGUAÍNA/TOCANTINS**

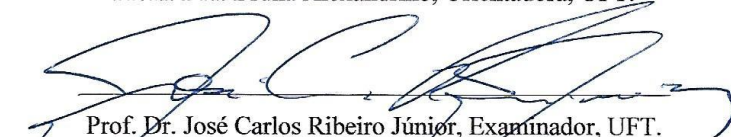
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade
Federal do Tocantins e aprovada em sua versão e forma final pela
orientadora e banca examinadora para obtenção do título de
Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos.

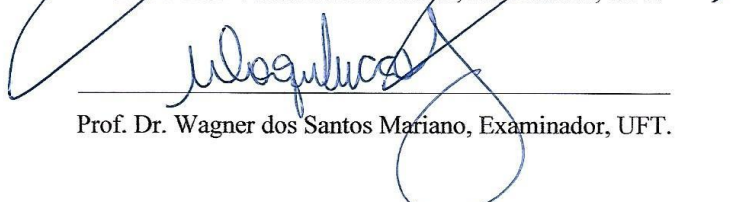
Data da Aprovação: 12/03/19

Banca examinadora



Prof.ª. Dra. Bruna Alexandrino, Orientadora, UFT.


Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior, Examinador, UFT.


Prof. Dr. Wagner dos Santos Mariano, Examinador, UFT.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus em sua infinita misericórdia, por permitir e me conceder saúde e serenidade para chegar até aqui diante de tantas dificuldades enfrentadas, principalmente por operar um milagre na vida do meu pai, Danilo, pois se fosse ao contrário, provavelmente eu não estaria aqui contando os dias para concluir meu mestrado.

Aos meus pais, Danilo e Rose, pois não existem palavras que possam expressar o sentimento de gratidão e amor que tenho por eles. Simplesmente me apoiaram em tudo, sem questionar ou mesmo entender o que significa um mestrado.

Ao meu amoroso esposo e amigo, Jayrton, por me suportar nesse período tão complicado e apoiar todas as decisões, mesmo que depois dos surtos eu percebia que havia me precipitado e estava errada. Ele sabia disso, mas deixava eu desabafar e concordava com tudo. Como sempre digo: “obrigada por ser meu amor”! Sou uma mulher empoderada e cheia de sonhos graças a ele!

A minha orientadora, Dra. Bruna, que desde a primeira mensagem trocada por e-mail, sem nunca ter me visto, foi muito educada e simpática. Me aceitou de braços abertos, mesmo eu sendo de área diferente da dela, conversou, aconselhou e orientou.

Ao professor Dr. José Carlos muito prestativo e com muito a contribuir, sem nem me conhecer me ajudou muito. Agradeço também aos profissionais da UEL que em parceria com o prof. José contribuíram significativamente para este trabalho.

A minha linda sobrinha, Pietra, por ter me ajudado durante semanas, além disso, sempre acreditou em mim.

Agradeço também a minha colega, Tainara, que participou incansavelmente, de forma voluntária, durante todo o projeto.

Agradeço ao colegiado de Biologia da UFT que honrosamente trabalhei, em especial minha querida amiga e eterna chefe Dra. Domenica e meu grande parceiro Dr. Gecilane. A instituição foi importantíssima no decorrer do meu mestrado, pois permitiu conciliar meu emprego com meu curso, algo muito difícil, mas que deu certo!

Ao meu pai científico, Dr. Wagner, que sempre acreditou em mim e me deu forças a nunca desistir, já me viu chorar e disse que aquilo era normal e que ia passar, além dos puxões de orelha do tipo “Helen, faz a prova e pronto”.

As técnicas Cristiane, Leidy e Carmem, por me repassarem seus conhecimentos e terem me auxiliado durante toda pesquisa.

Agradeço também minha coorientadora Dra. Silvia, que sempre foi muito prestativa e contribuiu com seus conhecimentos.

Aos meus colegas de turma 2017.1 pelos cafés e saberes compartilhados durante as aulas, principalmente pela corrente de força e estudo para passar em estatística.

Muito obrigada!

Quando cortaram os meus braços, eu chutei.
Quando cortaram minhas pernas, eu dei cabeçada.
Quando cortaram minha cabeça, eu mordei na jugular e não
soltei por nada, não soltei por nada!

Samurai – Projota

RESUMO

Os peixes são alimentos saudáveis com aceitação cada vez maior pelo consumidor. Pescados frescos são considerados peixes recém-capturados conservados apenas no gelo, comercializados informalmente. Na cidade de Araguaína, localizada no norte do estado do Tocantins/Brasil, é possível encontrar esse tipo de alimento rotineiramente em feiras e supermercados com custo acessível. Entretanto, estes quando não são capturados, armazenados ou manipulados de acordo com práticas higiênico-sanitárias adequadas, podem ser veiculadores de bactérias enteropatogênicas como *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* que eventualmente podem ocasionar doenças de transmissão alimentar (DTA's). O presente estudo teve como objetivo verificar a qualidade higiênico-sanitária e a segurança microbiológica de pescados frescos comercializados em feiras, peixarias e supermercados do município de Araguaína/TO e os possíveis perigos para a saúde pública através do seu consumo. Foram realizadas contagens de coliformes termotolerantes e microrganismos psicrotróficos, bem como, isolamento e identificação de *Salmonella* spp., *E. coli*. Das 33 amostras de pescados frescos coletadas, 49% (16/33) foram provenientes de supermercados, 12% (4/33) de peixarias e 39% (13/33) de feiras livres. Durante aquisição das amostras foi observado que a maioria dos comércios em questão não cumpriam medidas de conservação e manipulação adequadas destes produtos. A contagem de coliformes termotolerantes apresentou 6,06% (2/33) com números superiores a 1100 NMP/mL, o que indica condições higiênicas inadequadas e presença de possíveis enteropatógenos. Tratando-se da contagem de psicrotróficos, 54,54% (18/33) das amostras tiveram colônias incontáveis e 21,1% (7/33) apresentaram contagens acima de log 6, sugerindo que tais pescados não estavam com qualidade satisfatória. Após realização da PCR, constatou-se 24,24% (8/33) de amostras positivas para *Salmonella* spp e 9,09% (3/33) para *E. coli*, destas, uma foi positiva para os dois microrganismos. Os isolados de *E. coli* foram submetidos a pesquisa de genes de virulência "*Stx1*, *Stx2* e *eaeA*" e tiveram resultados negativos, tratando-se, portanto, de cepas comensais. Assim, foi possível perceber que boa parte dos pescados analisados comercializados na cidade de Araguaína/TO apresentam-se insatisfatórios, pois podem acarretar danos à saúde dos consumidores. Percebeu-se também que a legislação brasileira vigente RDC nº12/2001 não é abrangente quanto aos parâmetros microbiológicos necessários para comercialização de pescados *in natura*.

Palavras-Chave: Microbiologia de alimentos. Peixes frescos. Saúde Pública.

ABSTRACT

Fish are healthy foods with increasing consumer acceptance. Fresh fish are considered fresh caught fish kept on ice only, traded informally. In the city of Araguaína, located in the northern state of Tocantins/Brazil, it is possible to find this type of food routinely in fairs and supermarkets with affordable cost. However, when they are not captured, stored or handled according to appropriate hygienic sanitary practices, they may be carriers of enteropathogenic bacteria such as *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* that may eventually lead to foodborne diseases (DTAs). The present study aimed to verify hygienic sanitary quality and microbiological safety of fresh fish marketed in fairs, fishmongers and supermarkets in the municipality of Araguaína/TO and the possible dangers to public health through their consumption. Counts of thermotolerant coliforms and psychrotrophic microorganisms were carried out, as well as, isolation and identification of *Salmonella* spp., *E. coli*. Of the 33 fresh fish samples collected, 49% (16/33) came from supermarkets, 12% (4/33) of fishmongers and 39% (13/33) from free markets. During acquisition of the samples it was observed that most of the trades in question did not comply with measures of conservation and adequate manipulation of these products. The thermotolerant coliform count had 6,06% (2/33) samples with numbers greater than 1100 MPN / mL, which indicates inadequate hygienic conditions and presence of possible enteropathogens. As for psychrotrophic counts, 54.54% (18/33) samples had countless colonies and 18.18% (6/33) samples presented counts above log 6, suggesting that these fish were not of satisfactory quality. After PCR, 24,24% (8/33) samples positive for *Salmonella* spp. and 9,09% (3/33) for *E. coli* were found, of which one was positive for the two microorganisms. The *E. coli* isolates were tested for virulence genes "*Stx1*, *Stx2* and *eaeA*" and had negative results, thus being commensal strains. Therefore, it was possible to perceive that a good part of the analyzed fish commercialized in the city of Araguaína/TO are unsatisfactory, which can cause damage to the health of the consumers. It was also noticed that the current Brazilian law is not comprehensive regarding the microbiological parameters necessary for the commercialization of fresh fish.

Keywords: Food Microbiology. Fresh fish. Public health.

LISTA DE ABREVIATURAS

AVC - Acidente vascular cerebral

DAEC - *Escherichia coli* de adesão difusa

DEC - *Escherichia. coli* diarreioagênicas

DTA's - Doenças transmitidas por alimentos

EAEC - *Escherichia. coli* enteroagregativa

E. coli – *Escherihia coli*

EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasora

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica

ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica

FAO - Organização das Nações Unidas da Agricultura e Alimentação

NMP - Número Mais Provável

PBS -Tampão Fosfato Salino

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

RDC – Resolução nº12 de 2 de janeiro de 2001

RNA - Ácido ribonucleico

rRNA – RNA ribossomal

SPI – Ilha de patogenicidade

STEC - *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga

VISA - Vigilância Sanitária

WHO - World Health Organization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – <i>Piaractus mesopotamicus</i> (Holmberg, 1887) “pacu-caranha” comercializado na cidade de Araguaína-TO.....	30
Figura 2 –Feirante manipulando pescado comercializado em feira na cidade de Araguaína-TO.....	35
Figura 3 –Pescado comercializado em poucas quantidades de gelo em Supermercado na cidade de Araguaína TO.....	36
Figura 4 –Leitura positiva da PCR para genes <i>invA</i> de <i>Salmonella</i> spp. das amostras de pescados.....	45
Gráfico 1 –Número Mais Provável de Coliformes Termotolerantes de pescados frescos comercializados na cidade de Araguaína/TO.....	38
Gráfico 2 –Amostras de pescados insatisfatórias para contagem de microrganismos psicrotróficos de pescados frescos comercializados na cidade de Araguaína/TO.....	41
Quadro 1 –Principais características de <i>E. coli</i> diarregônicas.....	23
Quadro 2 –Esquema abreviado de Kauffmann e White – nomenclatura para os sorovares do gênero <i>Salmonella</i>	25
Quadro 3 –Sequência genética para primers de PCR de <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i>	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Amostras caracterizadas como <i>E. coli</i> nos testes bioquímicos e negativas para genes de virulência <i>eaeA</i> , <i>stx1</i> e <i>stx2</i>	42
Tabela 2 – Amostras positivas para <i>Salmonella</i> spp.....	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Objetivo Geral	15
1.2 Objetivos específicos	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Potencial, hábitos de consumo e produção de pescados no estado do Tocantins	16
2.3 Pescados frescos e saúde pública	18
2.4 Microrganismos indicadores	18
2.4.1 Coliformes Termotolerantes.....	19
2.4.2 Psicrotróficos.....	19
2.5 Enterobactérias	20
2.5.1 <i>Escherichia coli</i>	20
2.5.2 <i>Salmonella</i> spp.	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Amostragem	29
3.2 Coleta das amostras	29
3.3 Preparo das Amostras	30
3.4 Isolamento, identificação e contagem de microrganismos	31
3.4.1 Contagem de coliformes termotolerantes.....	31
3.4.2 Contagem de microrganismos psicrotróficos	31
3.4.3 Isolamento e identificação de <i>Salmonella</i> spp. e <i>E. coli</i>	31
3.4.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Contagem coliformes termotolerantes	37
4.2 Contagem de bactérias psicrotróficas	40
4.3 Pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	42
4.4 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	44
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
6 REFERÊNCIAS	48
ANEXOS	56

1 INTRODUÇÃO

O pescado é um alimento considerado saudável devido seu alto valor proteico e baixo teor de gordura. Além disso, tem aminoácidos essenciais e possui ácidos graxos poli-insaturados que previnem doenças cardiovasculares (SOARES et al., 2011).

Os peixes desempenham importante papel na economia de muitos países, pelo fato de sua abundância e excelente composição nutritiva (GATTI JÚNIOR, 2011). No Brasil, o consumo de pescado de água doce é mais expressivo que o consumo de pescado de água salgada, o que representa 6,474 kg/habitante e 2,102 kg/habitante respectivamente (PALHA, 2015).

O pescado é facilmente encontrado em feiras livres, porém, as condições higiênicas sanitárias muitas vezes são insatisfatórias. Esse alimento é rapidamente deteriorado em decorrência das suas propriedades biológicas e isso associado a condições inadequadas de manuseio, armazenamento e refrigeração que favorecem a multiplicação de bactérias, corroborando para possíveis prejuízos à saúde humana (MARTINS, 2015).

Produtos considerados *in natura* são aqueles que não foram submetidos a nenhum tipo de industrialização. Pescados podem ser comercializados como frescos, congelados ou resfriados (JULIO, 2015), sendo que pescados frescos são aqueles que tiveram apenas contato com o gelo

O comércio informal do pescado gera diversas preocupações, pois comerciantes e consumidores muitas vezes desconhecem os cuidados de higiene e conservação dos alimentos e também dos riscos de doenças que estes podem acarretar (PINHEIRO et al., 2009).

O pescado é um dos principais produtos relacionado as doenças transmitidas por alimentos (DTA's), pois pode se deteriorar em um curto período de tempo, mesmo quando submetido à refrigeração (VARGAS; QUINTAES, 2003).

As DTA's são causadas pela ingestão de água ou alimentos contaminados por uma grande diversidade de microrganismos, toxinas e agentes químicos ou físicos. Representam risco para milhões de pessoas segundo a Organização das Nações Unidas da Agricultura e Alimentação (FAO, 2016).

Diarreias associadas ao consumo de alimentos e águas impróprias são as principais causas de mortes em países pobres, cerca de 1,8 milhões de pessoas por ano, principalmente crianças, afirma a World Health Organization (WHO, 2002).

Muitos microrganismos podem ser encontrados nos pescados, como os coliformes termotolerantes, considerados indicadores higiênico-sanitários. Dos principais patógenos associados ao pescado estão a *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* e *Yersinia enterocolitica* (SOARES; GONÇALVES, 2012).

Na cidade de Araguaína, localizada ao norte do estado do Tocantins, é possível encontrar corriqueiramente peixes frescos em feiras livres, peixarias e também em grandes supermercados. Porém, pouco se sabe sobre a qualidade higiênico-sanitária e segurança microbiológica destes produtos. O peixe fresco de maior consumo no estado do Tocantins é o *Piaractus mesopotamicus* (FLORES; CHICRALA; SOARES, 2014), cujo nome popular é “pacu-caranha”.

A presença de enteropatógenos como *Salmonella* spp. e *E. coli* são preocupantes pois podem ocasionar surtos alimentares, além disso, a pesquisa desses microrganismos e dos coliformes termotolerantes permite avaliar a qualidade higiênica destes produtos e conseqüentemente a segurança para seu consumo. A contagem de microrganismos psicrotróficos relaciona-se com a qualidade geral do produto e também com suas formas de armazenamento e beneficiamento.

Portanto, a presente pesquisa é importante para servir de informação tanto para a prevenção à saúde dos consumidores quanto à contribuição para melhoria no comércio dos pescados frescos na cidade de Araguaína/TO.

1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo, verificar a qualidade higiênico-sanitária de pescados frescos comercializados em feiras e supermercados do município de Araguaína/TO e os possíveis riscos do seu consumo para a saúde pública.

1.2 Objetivos específicos

- Verificar a qualidade higiênico-sanitária dos pescados frescos através da quantificação de microrganismos indicadores como os coliformes termotolerantes e psicrotróficos;
- Pesquisar *Salmonella* spp. e *E.coli* e a presença genes de virulência em pescados frescos a fim de investigar os possíveis perigos microbiológicos através do consumo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Há quase 30 anos a piscicultura comercial surgiu no Brasil. Trata-se de uma atividade lucrativa que trouxe boas oportunidades econômicas para o produtor rural. A atividade dos “pesque-pague” contribuiu para isso, despertando nos empresários perspectivas para cultivo e alternativas de negócios (EMBRAPA, 2010).

Cerca de 430 (97%) das espécies cultivadas a partir do ano de 2007 foram domesticadas durante o século 20, das quais, 106 surgiram durante esse período (SEBRAE, 2015). A prática da piscicultura ocorre em todos os estados brasileiros, o que diferencia as produções são as espécies de peixes utilizadas, as formas cultivo e o tamanho da demanda (BARROS et al., 2011).

A piscicultura pode ser uma alternativa para a agricultura familiar, devido sua alta produtividade e por resultar em um alimento proteico e nutritivo de fácil comercialização (BACCARIN et al., 2009). A criação de peixes corrobora para o crescimento e a geração de empregos e renda para o setor rural (BARROS et al., 2011).

No Brasil, a piscicultura representa cerca de 80% da produção aquícola. A produção de pescados divide-se em pesca extrativista e a aquicultura. A pesca trata-se da retirada de recursos pesqueiros do ambiente natural e a aquicultura é o cultivo, comumente em um espaço confinado e controlado de organismos aquáticos, tais como peixes, camarões, ostras, caranguejos, dentre outros (SCHULTER; VIEIRA FILHO, 2017).

Dentre as espécies mais comuns produzidas no Brasil estão o tambaqui, pirarucu, pirapitinga, pintado, tilápia, pacu, carpa, dentre outros (SEBRAE, 2015). De acordo com a FAO (2016) a produção mundial de pescado atingiu no ano de 2014 a quantia de 167 milhões de toneladas e destas, 73,8 (44%) milhões foram provenientes da aquicultura.

2.1 Potencial, hábitos de consumo e produção de pescados no estado do Tocantins

Para Almeida e Mendes (2015) o estado do Tocantins é relativamente novo, sendo considerado como terra de oportunidades, pois tem solo fértil e clima definido, além de contar vários rios como o do Sono, Palmeiras, Formoso, Balsas, Paranã, Tocantins e Araguaia e contém a maior ilha fluvial do Brasil, conhecida como “Ilha do Bananal”.

Embora pertença à região norte, o Tocantins está localizado na zona de transição geográfica entre o cerrado e a floresta amazônica. Em relação às principais atividades econômicas, a produção

agrícola e a pecuária são destaques, em sequência as indústrias de beneficiamentos e mais recentemente a piscicultura (ALMEIDA; MENDES, 2015).

O Tocantins é exportador de peixes, com relevância para os estados circunvizinhos como Maranhão, Pará, Goiás e Mato Grosso. Estima-se que o estado em 2017 produziu entorno de 18.000 toneladas (SEAGRO, 2018).

O hábito de consumir peixes na região norte é superior a três vezes por semana, índice considerado, relativamente alto em relação as demais regiões do Brasil. Um dos motivos desse elevado consumo é a grande produção desses pescados, pois consequentemente o preço torna o alimento mais atrativo (LOPES; OLIVEIRA; RAMOS, 2016).

A região Norte do país se destaca no volume de pescado de água doce. O Tocantins concentra sua produção em espécies de piau, pintado, caranha, tambaqui e pirarucu, dentre outros (SALES, 2012).

A comercialização dos pescados atualmente no Brasil, seja da pesca ou da aquicultura, concentra-se em mercados, feiras livres e restaurantes. São encontrados em diversas formas, como filés, inteiro, pré-processado, fresco ou congelado (LOPES; OLIVEIRA, RAMOS, 2016).

2.2 Benefícios a saúde proporcionado pelo consumo de pescados

Os peixes possuem proteínas de alta digestibilidade e tem como crucial benefício sua qualidade de fração lipídica com alto teor de ômega-3 em relação à carne bovina. Além disso, há um grande número de micronutrientes, como iodo, ferro, cálcio, cobre, zinco, selênio e vitaminas como A, B e D (FILGUEIRA, 2017).

O perfil proteico dos pescados abrange os aminoácidos essenciais para o ser humano e assim como as proteínas do leite, ovo e das carnes de mamíferos, têm elevado valor biológico (SARTORI; AMANCIO, 2012). Dentre os benefícios de consumo de uma ou duas porções de pescados por semana estão a redução do risco de acidente vascular cerebral (AVC), depressão, Alzheimer e doença cardíaca (HARVARD, 2012).

A diversidade de benefícios do consumo dos pescados é comprovada, desde que esse alimento tenha qualidade adequada a fim de conservar sua riqueza de nutrientes, e para isso, depende do esforço entre produtores, comerciantes, órgãos governamentais e consumidores (GALVÃO et al., 2014).

2.3 Pescados frescos e saúde pública

Os pescados são alimentos de fácil deterioração e isso requer cuidados higiênico-sanitários desde sua produção até o consumo. A contaminação do pescado pode ocorrer de diversas formas como condições insatisfatórias de manipulação, armazenamento, sazonalidade, captura e temperatura que irão influenciar diretamente em sua microbiota (GALVÃO et al., 2014).

A origem do pescado é crucial, visto que a água onde são criados reflete em sua microbiota. Se esta for de má qualidade, pode transmitir patógenos e acarretar prejuízos à saúde dos consumidores (CASTRO, 2016).

Muitos problemas de saúde se devem ao consumo de pescado, como é o caso das ocorrências de DTA's. Conforme Barreto et al. (2012) no Brasil essas doenças são bastante comuns, embora não seja dada importância pela população de baixo nível socioeconômico e existe a baixa notificação de ocorrência pelos órgãos competentes. De acordo com Santos et al. (2012) uma doença causada por alimento pode ocorrer por causa do crescimento de microrganismos ou também pela produção de toxinas.

A qualidade dos alimentos de origem animal comercializados em feiras livres é preocupante, pois geralmente esses produtos são expostos em barracas, desprovidos de refrigeração e proteção com presença de poeira e insetos (BARRETO et al., 2012).

O pescado pode ser veiculador de diversos patógenos para os seres humanos, como os dos gêneros *Vibrio* e *Salmonella*, além de espécies como *E. coli* e *Staphylococcus aureus* e podem acarretar gastroenterites agudas após o consumo (GALVÃO et al., 2014). Portanto, este produto necessita de atenção higiênico-sanitária a fim de conferir segurança microbiológica aos consumidores.

A preocupação com o comércio de pescados frescos se dá pelo fato de não haver inspeção sanitária. Ou seja, esses produtos são desprovidos do sistema de garantia de qualidade, pois não passam pelo processo industrial, nem por normas de segurança alimentar, o que pode colocar em risco à saúde do consumidor (GALVÃO et al., 2014).

2.4 Microrganismos indicadores

A utilização de indicadores como coliformes totais e termotolerantes fornece informações seguras sobre condições higiênicas e eventual presença de patógenos. Assim como

a pesquisa de organismos patogênicos como a *Salmonella* spp. tem grande importância para a saúde pública, sendo essencial sua detecção para determinação da qualidade do produto (LIMA; REIS, 2002).

A segurança dos alimentos é uma preocupação mundial, pois as doenças são prejudiciais a população, além de onerar as despesas dos sistemas de saúde e a própria sociedade (PALHA, 2015).

2.4.1 Coliformes Termotolerantes

Os coliformes termotolerantes são um subgrupo dos coliformes totais com capacidade de fermentar a lactose e produzir gás quando incubados a uma temperatura de 45°C por no máximo 48 horas. A *E. coli* é um coliforme termotolerante e tem como *habitat*, o intestino humano e animal, por este fato, esse microrganismo é utilizado como indicador de contaminação fecal (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

As bactérias classificadas no grupo dos coliformes pertencem a família das *Enterobacteriaceae*. Tratam-se de bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos que podem ser encontradas no solo, água, plantas e trato intestinal de humanos e demais animais de sangue quente (LIMA, 2012).

Coliformes termotolerantes presentes em água ou alimentos evidencia o risco da presença de organismos patogênicos de origem fecal. Fazem parte deste grupo os gêneros: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (SILVA et al., 2007).

2.4.2 Psicotróficos

O termo *psychrophile* foi utilizado por Schmidt-Nielsen em 1902 para classificar microrganismos que crescem a 0°C. Tais microrganismos se desenvolvem em intervalos de temperaturas abaixo de zero até 20°C. O mais aceito é que os psicotróficos são microrganismos caracterizados por crescer em temperaturas de 7°C dentro de 7 a 10 dias, além de produzir colônias visíveis (JAY, 2005).

Os psicotróficos não constituem um grupo taxonômico específico, pois estão distribuídos em aproximadamente 15 gêneros distintos, dentre Gram-positivos e Gram-negativos (MARTINS et al., 2004).

Em pescado refrigerado e outros alimentos, as bactérias psicotróficas participam diretamente do processo de deterioração pelo fato de se multiplicarem bem nessas condições. Esse grupo microbiano utiliza o pescado como substrato para realização de suas atividades

metabólicas, produzindo substâncias que conferem odor e sabor desagradável ao alimento (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

2.5 Enterobactérias

O grupo das enterobactérias caracteriza-se por microrganismos da família *Enterobacteriaceae*. Existem mais de 40 gêneros descritos para esta família. Entretanto, apesar da grande heterogeneidade e complexidade da família, poucas espécies podem comprometer à saúde humana por meio de infecções do trato respiratório, gastrointestinal e bacteremias (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

Os microrganismos do gênero *Salmonella* spp. são patogênicas ao homem, enquanto a maior dos isolados de *E. coli* são comensais e podem vir a causar patologias oportunistas ou quando há presença de cepas patogênicas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

Para Oliveira et al. (2010) grande parte dos surtos diarreicos tem relação com à ingestão de alimentos contaminados com microrganismos enteropatogênicos. A resolução RDC nº 12 de janeiro de 2001 é competente quanto à análise microbiológica de alimentos e afirma que a presença de *Salmonella* em 25 g de alimentos é suficiente para descartá-lo como alimento (BRASIL, 2001).

A *E. coli* se desenvolve no trato intestinal do homem e alguns animais, portanto, sua presença em alimentos ou água, indica contaminação fecal, o que pode ser um risco à saúde, pois a presença desse microrganismo indica a possível presença de outros enteropatógenos (SILVA-JÚNIOR et al., 2015).

A detecção de enteropatógenos em alimentos é essencial, visto que estes microrganismos podem acarretar DTA's. A presença de *Salmonella* spp. e *E. coli* indicam inadequadas práticas higiênico-sanitária durante a cadeia produtiva. A análise microbiológica destes produtos, bem como, o treinamento de profissionais que atuam no beneficiamento e a informação aos consumidores de que pescados não devem ser consumidos crus ou malcozidos podem auxiliar na prevenção dos surtos alimentares e na segurança microbiológica do pescado.

2.5.1 *Escherichia coli*

A *E. coli* pertence à família *Enterobacteriaceae*. Caracteriza-se como cocobacilo Gram negativo, não esporulado, capaz de fermentar glicose, lactose e produzir ácido e gás (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

As provas bioquímicas que sugerem a espécie *E. coli* são: lactose, glicose, manitol, ácido, gás, e vermelho metila positivas. As provas com resultado negativo compreendem citrato, sacarose, malonato e lisina (TRABULSI et al., 2004).

As cepas patogênicas de *E. coli* possuem variados fatores de virulência que contribuem para potencializar sua patogenicidade. Essas cepas apresentam mecanismos patogênicos específicos, sorotipos distintos e produzem infecções e síndromes diferentes (DIAS, 2011).

A patogenicidade da *E. coli* está relacionada à sua capacidade de colonizar o epitélio intestinal ou produzir toxinas. A colonização é mediada por fatores denominados fímbrias, estruturas proteicas, consideradas antígenos de superfície e de grande atividade antigênica, sendo um importante fator de avaliação para diagnóstico e identificação de cepas patogênicas (NATARO; KAPER, 1998).

A *E. coli* é classificada sorologicamente em sorogrupos e sorotipos com base na sua composição antigênica. Antígenos “O” ou somáticos, são característicos dos sorogrupos, enquanto os antígenos “H” ou flagelares, pertencem aos sorotipos. Elas podem expressar também os antígenos “K”, estes são cruciais à patogênese (BERTÃO; SARIDAKIS, 2007).

Os sorogrupos de *E. coli* são diferenciados pelos modos diferentes que estas expressam os genes que codificam fatores de virulência. Estes são responsáveis pela colonização dos microrganismos, bem como acarretam a alterações fisiológicas relacionadas a homeostase do hospedeiro (VIEIRA, 2009).

Estes microrganismos são produtores de diversos mecanismos patogênicos, como toxinas, divididas em endotoxinas, exotoxinas e fímbrias. Algumas cepas de *E. coli* produzem toxinas proteicas como hemolisina, enterotoxina termolábil e termoestável, *Shiga-like* e fator necrosante citotóxico (BRITO et al., 2004).

A *E. coli* tornou-se considerada como patógeno de origem alimentar em 1997 após provocar aproximadamente 400 casos após ingestão de queijos em estados americanos (JAY, 2005)

A principal via de infecção por *E. coli* é alimentar, sendo, portanto, necessário uma maior atenção na segurança dos alimentos. É importante ressaltar constantes melhorias dos métodos de processamento, cautela por parte de todos os envolvidos na cadeia de produção, a fim de reduzir a contaminação e infecção desses patógenos e conseqüentemente a ocorrência de doenças transmitidas pelos mesmos (MACIEL, 2016).

Em 2016, doenças diarreicas mataram cerca de 1,4 milhão de pessoas em todo o mundo, segundo a WHO (2018). Apesar da importância da identificação de estirpes diarreio gênicas de *E. coli* no meio ambiente, no Brasil, tais estudos são escassos (DRUMOND et al., 2018).

As linhagens patogênicas ou diarreio gênicas de *E. coli* são classificadas em categorias de acordo com os mecanismos de virulência que apresentam e com o conjunto de sinais e sintomas das doenças que provocam (DIAS, 2011).

A *E. coli* está relacionada com diversas patologias, dentre elas, gastroenterites causadas por *E. coli* diarreio gênicas (DEC), conforme quadro 1. As cepas de *E. coli* responsáveis por gastroenterites são: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* de adesão difusa (DAEC) (WINN JÚNIOR et al., 2008).

A DEC possui grupos relevantes pela importância clínica devido à produção de enterotoxinas, como a toxina Shiga (STEC) que em casos mais severos progride para colites hemorrágicas, podendo levar a óbito. É também considerada como um patógeno alimentar emergente com sintomas graves (DRUMOND et al., 2018). O maior número de surtos desencadeados por essa categoria está relacionado com o sorogrupo dominante “O157” (KAWANO et al., 2012).

A EPEC é considerada uma das principais causas de diarreias cosmopolita (HU et al., 2015). Este sorogrupo tem como principal diferença as lesões desencadeadas no hospedeiro através de aderência (COURA et al., 2014).

As lesões provocadas pela EPEC são nomeadas como “A/E” e relacionam-se com a adesão do microrganismo à célula do hospedeiro. Os genes atribuídos a esta função localizam-se em uma ilha de patogenicidade denominada “LEE” acompanhada de um sistema de secreção tipo III necessária para efetivação da lesão (GOUFFAUX, 2012).

Quadro 1 – Principais características de *E. coli* diarregônicas

Termo	Sigla	Fenótipo patogênico	Sinais e sintomas
<i>E. coli</i> enteroxigênica	ETEC	Produção de enterotoxinas. Não provocam lesão do epitélio mucoso. Sítio de Ação: Intestino delgado.	Duas síndromes clínicas conhecidas: “diarreia da criança desmamada e diarreia do viajante”. Caracterizada por diarreia aquosa, cólicas abdominais leves e alguns casos apresentam desidratação e febre.
<i>E. coli</i> enteropatogênica	EPEC	Aderem as células epiteliais intestinais. Produzem lesões histopatológicas. Sítio de Ação: Intestino delgado.	Acomete lactentes. Caracteriza-se por febre baixa, mal-estar, vômito, diarreia aquosa com presença de muco.
<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga	STEC	Aderem a mucosa intestinal e produzem toxina Shiga	Cólicas Abdominais intensas. Presença de diarreia aquosa que rapidamente evolui para sanguinolenta.
<i>E. coli</i> enteroinvasiva	EIEC	Invade células epiteliais. Sítio de Ação: Intestino grosso.	Diarreia aquosa indistinguível da ETEC, porém alguns casos apresentam febre e colite, mediante sangue e muco.
<i>E. coli</i> êntero-hemorrágica	EHEC	Produz toxinas – êntero-hemolisina. Presença do gene <i>eae</i> e toxina Shiga Sítio de Ação: Intestino grosso.	Diarreia com presença de sangue. Dor abdominal.
<i>E. coli</i> enteroagregativa	EAEC	Adere às células epiteliais e produz toxinas. Sítio de Ação: Intestino delgado.	Diarreia secretora, aquosa e mucoide com febre baixa. Acomete principalmente crianças.
E. coli Difusamente aderente	DAEC	Adere às células epiteliais.	Diarreia aquosa.

Fonte: Winn Júnior et al. (2008), adaptado pela autora.

Os genes intimina *eae* e *bfpA* estão relacionados com a EPEC (ARANDA et al., 2004). O gene *eae* é responsável pelo tipo de lesão e caso a cepa apresente esse gene acrescida de toxina Shiga a mesma é considerada como EHEC (AFSET et al., 2004).

O mecanismo que permite a toxina atuar no organismo se dá por meio da inativação da síntese proteica ao remover a adenina de um sítio específico do desoxiribonucleico RNA mensageiro (rRNA) (BROOKS et al., 2009).

2.5.2 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* foi nomeado em 1900, por Lignières, em homenagem a Daniel Salmon, que isolou o microrganismo conhecido como *Salmonella enterica* sorovar Choleraesuis a partir de suínos (BRASIL, 2011).

Salmonella é um gênero pertencente à família *Enterobacteriaceae*, definido como bastonetes Gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos e oxidase negativos. Estas bactérias possuem a forma de bacilos curtos com largura de 0,7 a 1,5 µm e comprimento de 2,0 a 5,0 µm. A temperatura de crescimento varia de 5 a 45°C, com temperatura ótima de 37°C (MENDONÇA, 2016).

As provas bioquímicas que sugerem o gênero *Salmonella* são vermelho metila, lisina, citrato, glicose e manitol positivos. Já as provas de ureia, indol, malonato, lactose e sacarose são negativas (BRASIL, 2011). A maioria desses microrganismos se movem por meio de flagelos, formam gás a partir da glicose e algumas produzem sulfeto de hidrogênio (BROOKS et al., 2009).

O gênero *Salmonella* é constituído por três espécies, *S. entérica*, *S. bongori* e a *S. subterrânea*. A primeira espécie citada acima é dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (MENDONÇA, 2016). A *Salmonella subterrânea* foi proposta por Shelobolina et al. em 2004, isolada de sedimentos de subsolo com baixo pH. Através de análise genômica, os autores perceberam que essa estirpe foi 96,4% semelhante a *Salmonella bongori* (MENDONÇA, 2011).

As salmonelas têm características imunológicas baseadas em três antígenos de superfície celular. O antígeno “O” ou somático; antígeno “H” ou flagelar e antígeno Vi – camada polissacarídica externa (MADIGAN et al., 2010).

De acordo com Madigan et al. (2010) os antígenos “O” são componente dos lipopolissacarídeos e formam a camada mais externa da membrana dos organismos. Estes são

também denominados de endotoxinas. São liberadas quando a célula sofre lise e acarreta nos hospedeiros sintomas como febre e diarreias. Os antígenos “O” são resistentes ao calor e álcool.

Os antígenos “H” são encontrados nos flagelos e podem ser desnaturados por calor e álcool e o que os determina é a sequência de aminoácidos na proteína flagelar. Já os antígenos “K” – camada polissacarídica ou proteica externa – podem estar associados à virulência e pertencem a apenas algumas bactérias (BROOKS et al., 2009).

Os antígenos “Vi” estão presentes no envoltório celular e existe apenas um tipo sorológico de antígeno “Vi” que é encontrado em três sorotipos de *Salmonella*: *S. Typhi*, *S. Paratyphi* e *S. Dublin* (MENDONÇA, 2016).

Mais de 2.500 sorotipos de *Salmonella* já foram descritos, no entanto, menos de 100 sorotipos estão envolvidos em casos de infecções humanas. A espécie *S. bongori* agrupa 22 sorotipos e as subespécies de *S. enterica* agrupam mais de 2400 (POPOFF; LE MINOR, 2005).

A classificação de *Salmonella* em espécies é pouco usada nos estudos epidemiológicos, sendo mais conhecida e utilizada a nomenclatura relacionada com a sorotipagem. O esquema utilizado na divisão em sorotipos é o de Kauffmann e White, baseado nas diferenças encontradas em certas estruturas antigênicas superficiais das células (MENDONÇA, 2016).

Os antígenos “O” são designados por números arábicos e caracterizam os sorogrupos de *Salmonella*. Os antígenos “H” são designados pelas letras minúsculas do alfabeto (fase 1) e por números arábicos (fase 2). O antígeno “Vi”, se presente, fica entre colchetes. Tais informações estão organizadas no quadro 2.

Quadro 2 - Esquema abreviado de Kauffmann e White - Nomenclatura relacionada com a sorotipagem do gênero *Salmonella*

Sorovar	Grupo	Antígeno “O”	Antígeno “H” Fase 1	Antígeno “H” Fase 2
<i>S. Paratyphi A</i>	O:2 (A)	1,2,12	a	[1,5]
<i>S. Paratyphi B</i>	O:4 (B)	1,4, [5], 12	b	1,2
<i>S. Typhimurium</i>		1,4, [5], 12	i	1,2

Fonte: MENDONÇA (2016), adaptado pela autora.

Tavechio (2006) afirma que poucos sorotipos de *Salmonella* são adaptados a determinados hospedeiros, os estritamente adaptados ao homem são *S. Typhi*, *S. Paratyphi* e *S. Sendai*, responsáveis pela febre entérica ou febre tifóide.

Os sorovares como a *S. Pullorum*, *S. Gallinarum*, *S. Abortusovis* e *S. Cholerasuis* estão mais adaptadas aos animais domésticos e silvestres e podem tornar-se fontes de infecção à espécie humana (SVAITER et al., 2013).

A maioria dos fatores de virulência de *Salmonella enterica* são determinados por genes cromossomais, localizados nas ilhas de patogenicidade (SPI's). As SPI's contêm um ou mais genes de virulência, estão presentes no genoma de bactérias patogênicas (SCHMIDT; HENSEL, 2004). Já foram caracterizadas 17 SPI's, algumas são relacionadas com gênero enquanto outras são exclusivas de alguns sorotipos (OLIVEIRA et al., 2013).

Na SPI-1 encontram-se os genes relacionados com a invasão. Essa habilidade é um importante fator para virulência de *Salmonella enterica* (SCHMIDT; HENSEL, 2004). Trata-se de mecanismos que permitem que proteínas efetoras interajam com os domínios de proteínas de modo que possibilitam a multiplicação intracelular das *Salmonella* spp. e infecção sistêmica (VIEIRA, 2009).

A SPI-2 é encarregada de conduzir as proteínas efetoras que protegem os microrganismos dos mecanismos de defesa. Isso possibilita a sobrevivência no interior dos fagócitos (VIEIRA, 2009). Na SPI-3 encontram-se os genes importantes para a capacidade de sobreviver dentro de macrófagos.

O SPI-4 é responsável por codificar o Sistema de Secreção do Tipo 1. Permite o deslocamento de proteínas essenciais para colonização intestinal (OLIVEIRA et al., 2013). O SPI-5 é encarregado de codificar as proteínas efetoras que em conjunto a outras proteínas são necessárias a enteropatogenicidade no hospedeiro suscetível (FARIA, 2013).

Em isolados de *S. Typhi* a produção de cápsula polissacarídica “Vi” está relacionada com a ilha de patogenicidade SPI-7, tal antígeno protege o patógeno dos mecanismos de imunidade inata e mediada por anticorpos do hospedeiro (FERREIRA; CAMPOS, 2008).

Os plasmídeos são elementos citoplasmáticos que podem se autoreplicar. A importância dos plasmídeos advém na sua habilidade de possuir genes de virulência e codificar mecanismos de virulência e resistência a antibióticos (QUINN et al, 2005).

A identificação e sequenciamento de plasmídeos são utilizados para avaliar possíveis mecanismos de virulência, além de determinar a sua semelhança, origem e grau de afinidade entre a diversidade do grupo *Salmonella* (BLEICHER et al., 2013).

Para Tozetto (2006) as infecções ocasionadas pelo gênero *Salmonella* apresentam complexidade em sua patogênese. O processo de doença inicia-se com a transmissão do agente para um hospedeiro suscetível, normalmente por meio do alimento contaminado. Uma quantidade de inóculo considerável é necessária para resistir ao ácido estomacal e competir com

a microbiota intestinal. No intestino, os processos de aderência e invasão são fundamentais para o estabelecimento das infecções causadas por *Salmonella* spp. (TOZETTO, 2006).

De acordo com Cardoso e Tessari (2008) a *Salmonella* spp. tem distribuição cosmopolita. São capazes de infectar grande número de animais como mamíferos, répteis e até mesmo os insetos. As aves são um dos importantes reservatórios capazes de introduzir a salmonela na cadeia alimentar do homem.

O *habitat* primário da *Salmonella* spp. é o trato digestório de animais como pássaros, répteis e humanos. Esses microrganismos são excretados nas fezes e podem ser transmitidos por insetos e águas contaminadas. Além disso, esse agente pode ser encontrada em outras partes do corpo, como baço, fígado, bile e linfonodos (JAY, 2005).

De acordo com Brooks et al. (2009) a água, leite e derivados, frutos do mar, ovos, carnes contaminados com *Salmonella* spp. podem servir como fonte de infecção para os humanos, animais domésticos e aves.

Algumas vias de transmissão da *Salmonella* spp. em aves pode ser transovariana e também por meio das fezes durante a passagem do ovo pela cloaca. As bactérias penetram pela casca do ovo que abriga o filhote, e estes podem tornam-se fonte de infecção. Bem como, o consumo dos ovos contaminados malcozidos também pode vir infectar o ser humano (MINE, 2005).

De acordo com Jay (2005) a infecção com significativo número de *Salmonella* spp., tanto espécies com sorovares não-hospedeiro-específicos podem acarretar em uma síndrome após 12 a 14 horas da ingestão. Os sintomas comuns são náuseas, vômitos, dores abdominais, dor de cabeça, calafrios e diarreia. A taxa média de mortalidade em média é de 4,1 %.

De acordo com Oliveira et al. (2013) a *Salmonella* pode acarretar desde uma infecção gastrointestinal leve até uma infecção sistêmica. Entretanto, o sorovar, a quantidade do inóculo, os fatores de virulência e o estado imunológico do hospedeiro são fatores que necessitam estar correlacionados para desenvolver a doença.

As doenças causadas pelas bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella* dividem-se em três, sendo: febre tifoide, transmitida pela *Salmonella* Typhi; febres entéricas, com agente patogênico *Salmonella* Paratyphi A, B e C; e as salmoneloses, ocasionadas pelos demais sorotipos de *Salmonella* (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

A febre tifóide é uma doença sistêmica severa caracterizada por febre prolongada, dor abdominal, diarreia, esplenomegalia e podem surgir complicações como hemorragia e perfuração intestinal (TOZETTO, 2006).

Além de serem causa comum de gastroenterite, estirpes de *Salmonella* não tifóide também podem causar diversas infecções extra intestinais graves. As infecções causadas por *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, geralmente são restritas ao trato gastrointestinal, entretanto *Salmonella* Dublin e *Salmonella* Choleraesuis estão associadas com bacteremia (OHL; MILLER, 2011).

As bactérias do gênero *Salmonella* podem sobreviver em temperaturas de cozimento relativamente baixas, como em ovos, carnes recheadas ou malpassadas. A falta de boas práticas na manipulação dos alimentos contribui para a disseminação desses microrganismos (TOZETTO, 2006).

A contaminação do alimento também pode ocorrer após o cozimento, através de contaminação cruzada por meio dos utensílios de cozinha ou mãos contaminadas. A multiplicação das bactérias pode acontecer também, caso o alimento não seja refrigerado (KAYE, 2010). A maioria dos casos de infecção por *Salmonella* em humanos, relacionados ao consumo de pescado, são causados pelos sorovares *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (SANTIAGO et al., 2013).

No Brasil, entre os anos de 2000 a 2017, os surtos alimentares foram ocasionados por diversos agentes etiológicos, como vírus, bactérias, fungos e parasitos. Nesse ranking, o gênero *Salmonella* spp. liderou com 35% as doenças de origem alimentar. Os pescados assumiram a 14ª posição (0,85%) como alimentos incriminados nos surtos (BRASIL, 2018).

Uma diversidade de alimentos pode ser contaminada com a *Salmonella* spp. Os que possuem alto teor de umidade, proteína e carboidratos como carne bovina, suínos, aves, ovos, leite e derivados, pescados e sobremesas recheadas, são mais susceptíveis à deterioração (SHINOHARA et al, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na cidade de Araguaína, localizada na região norte do Estado do Tocantins. A cidade tem clima tropical úmido e suas temperaturas variam entre 20° C e 32° C. Caracteriza-se por estação definida de chuvas entre os meses de novembro e maio e período de estiagem de junho a outubro. Tem vegetação mista, com características de cerrado, matas ciliares e matas tropicais. Faz parte de sua hidrografia a Bacia Hidrográfica do Rio Araguaia e seus afluentes, entre eles, destaque para o Rio Lontra¹.

3.1 Amostragem

Para realização da pesquisa, foi solicitado uma lista com estabelecimentos cadastrados na Vigilância Sanitária da cidade de Araguaína-TO (VISA), conforme anexo. A lista conta com 55 comerciantes cadastrados, mas apenas 36 estavam comercializando peixe fresco na época da colheita para o experimento, pois muitos locais de venda tratavam-se de pequenos comerciantes que disponibilizam esse produto apenas na quaresma.

A ferramenta utilizada para cálculo amostras foi a “Open Epi” (DEAN; SULLIVAN; SOE, 2006). Para efeito do cálculo foi utilizada a prevalência esperada de 50% com 95% de nível de confiança e 5% de margem de erro. Desta forma, o número determinado de amostras foi 33.

3.2 Coleta das amostras

A coleta das amostras foi realizada em supermercados, peixarias e feiras pelo período de maio a setembro de 2018 na cidade de Araguaína - TO. Os pontos de vendas e os pescados frescos foram escolhidos aleatoriamente – uma amostra por estabelecimento. Optou-se por uma espécie comumente comercializada na região, o *Piaractus mesopotamicus*, popularmente conhecido como “peixe pacu-caranha”, ilustrado na figura 1. O preço das amostras no momento da pesquisa variou entre R\$10,00 a R\$15,00 o quilo e o pescado foi adquirido inteiro.

As amostras foram acondicionadas em isopor térmico com gelo e processadas no máximo 2 horas depois de coletadas no Laboratório de Higiene e Saúde Pública da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, localizado na Universidade Federal do Tocantins, *Campus*

¹ Disponível em: <http://www.araguaina.to.gov.br/portal/paginas.php?p=turismo>. Acesso em 01 de maio de 2018.

de Araguaína-TO e a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Estadual de Londrina, Paraná (UEL).

Figura 1 – *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) “pacu-caranha” comercializado na cidade de Araguaína-TO



Fonte: Portal Pantanal²

3.3 Preparo das Amostras

A metodologia utilizada para a presente pesquisa foi a descrita por Silva et al. (2007). Optou-se pela técnica de lavagem superficial, cujos autores afirmam que se aplica a alimentos de contaminação predominantemente superficial, como carcaças de aves inteiras, cortes de aves, peixes, cascas de ovos, dentre outros. O diluente utilizado foi o Tampão Fosfato Salino pH 7,2 (PBS) (SILVA et al., 2007).

Essa técnica foi escolhida pelo fato das amostras se tratarem de peixes *in natura* conservados no gelo, desprovidos de inspeção sanitária, expostos a insetos, poeiras, oscilação de temperatura e constantemente manuseados por comerciantes e consumidores para a escolha/compra do produto. Essas condições podem contaminar o alimento e torná-lo um risco a saúde do consumidor.

² Disponível em:

<http://www.gopantanal.com.br/index.php?modulo=RkFVTkFfRkxPUkE=&categoria=4&id_fauna_flora=12>
acesso em 18 de março de 2019

3.4 Isolamento, identificação e contagem de microrganismos

3.4.1 Contagem de coliformes termotolerantes

As amostras foram colocadas individualmente em sacos “zip Lock” contendo 225mL do diluente PBS para lavagem do produto. Foi retirado da lavagem uma alíquota de 1 mL procedida de diluições seriadas em tubos contendo 10 mL de Caldo Lauril Sulfato de Sódio (LST) com tubos de Durhan invertidos e incubados a 37°C por 24 horas. Foi realizada uma série de três tubos para cada diluição. Os tubos que apresentaram formação de gás no Caldo LST, foram semeados em tubos contendo 10 mL de Caldo EC de acordo com as respectivas diluições e incubados a 45° por 48 horas (SILVA et al., 2007). Os resultados foram lidos na tabela de Número Mais Provável – NMP.

3.4.2 Contagem de microrganismos psicrotróficos

Essa metodologia foi realizada através do “método das diluições em placas”, proposta por Vermelho et al., (2006). A partir da lavagem do PBS, foi utilizado 1mL para diluir em 9mL de solução salina. Foram preparadas sete diluições em série e posteriormente, uma alíquota de 1mL de cada diluição em duplicata, foram distribuídas em respectivas placas de Petri contendo ágar Plate Count Agar (PCA) resfriados. De acordo com Silva et al. (2007) as placas foram homogeneizadas e incubadas a 7°C pelo período de dez dias. Procedeu-se a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) após prazo estabelecido.

3.4.3 Isolamento e identificação de *Salmonella* spp. e *E. coli*

Após a lavagem superficial, foi retirada 25mL de cada amostra e acondicionada em 225mL de água peptonada tamponada, homogeneizadas e incubadas a 37°C por 24 horas com a finalidade de pré-enriquecimento (SILVA et al., 2007).

Posteriormente, para o enriquecimento seletivo, 1 mL da diluição anterior foi transferida para tubos de ensaio, contendo 10 mL de caldo selenito cistina e 100 µl em caldo Rappaport Vassiliadis e incubados a 37°C e 45°C por 24/48 horas respectivamente. Para o isolamento de *Salmonella* spp., foram realizadas estrias de amostras provenientes do caldo selenito em ágar MacConkey e Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e incubados a 37°C por 24 horas. Após esse período, foi observado o desenvolvimento de colônias típicas e atípicas.

De acordo com Silva et al. (2007) em ágar XLD, cepas de *Salmonella* produtoras de sulfeto de hidrogênio (H₂S) podem produzir colônias de coloração pretas. Já as cepas de *Salmonella* (H₂S) negativas podem produzir colônias cor de rosa e as cepas de *Salmonella* lactose positivas produzem colônias amarelas.

Para o isolamento da *E. coli*, foram realizadas estrias de amostras provenientes do caldo Rappaport em ágar MacConkey e Ágar XLD sendo incubados por 24 horas a 37°C e observando posteriormente, o desenvolvimento de colônias típicas e atípicas. Em ágar MacConkey, as colônias sugestivas de *E. coli* apresentam coloração rosa (BRASIL, 2004)

As colônias típicas e atípicas de *Salmonella* spp. e *E. coli* foram inoculadas em tubos Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) por profundidade e estrias e incubados a 37°C por 24 horas, após esse período, foi efetuada a interpretação dos tubos. Foram realizadas as provas bioquímicas nas colônias sugestivas - produção de indol, vermelho metila, SIM (indol, H₂S e motilidade), citrato de Simmons, ureia, manitol, lisina e malonato e as provas dos açúcares: glicose, lactose, sacarose (SILVA et al., 2007).

3.4.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para realização da PCR inicialmente procedeu-se o preparo para a extração do DNA dos microrganismos sugestivos de *Salmonella* spp. e *E. coli*. As estirpes foram cultivadas em Caldo de Infusão de cérebro e coração (BHI) pelo período de 48 horas a uma temperatura de 35°C. Posteriormente, foram distribuídas alíquotas de 1 ml das amostras em tubos de microcentrífuga e centrifugados durante 5 minutos a 14.000 rpm. A concentração estimada de cada microrganismo após o período de incubação foi de aproximadamente 10⁶ UFC/mL. O sobrenadante foi rejeitado e utilizou-se os sedimentos para o processo de extração do DNA (RIBEIRO JUNIOR et al., 2016).

A técnica de extração utilizada foi a “Lise celular por simples ebulição”, proposta por Ribeiro Junior et al. (2016). Os sedimentos bacterianos foram suspensos em 200 µl de tampão TE (Tris-HCl a [10 mM]: EDTA [1 mM]) e submetidos a 15 minutos de ebulição. Após ferver, os tubos de microcentrífuga foram acondicionados em banho de gelo pelo período de 15 minutos, posteriormente, foi realizada a centrifugação por 5 minutos a 14.000 rpm a temperatura ambiente. O sobrenadante contendo DNA (100 µl) foi transferido para outro tubo limpo e guardado a -20°C.

Para *E. coli*, foi realizada a PCR para a pesquisa de cepas patogênicas, conforme metodologia proposta por Paton e Paton (1998). Para pesquisa de *Escherichia coli*

enteropatogênica (EPEC) foi realizada a pesquisa do gene *eaeA* em ensaios individuais e para pesquisa de *Escherichia coli produtora de toxina shiga like* (STEC) foram realizados ensaios de PCR multiplex para a detecção simultânea dos genes *stx1* e *stx2*, conforme quadro 3.

Quadro 3 - Sequência genética para primers PCR de *E. coli* e *Salmonella*

Primer	Sequência	Tamanho (pb)	Micro-organismo	Genes pesquisados	Referência
<i>stx1F</i>	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	180		<i>Stx1</i>	
<i>stx1R</i>	AGAACGCCCACTGAGATCATC				
<i>stx2F</i>	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	255	<i>E. coli</i>	<i>Stx2</i>	Paton e Paton (1998)
<i>stx2R</i>	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG				
<i>eaeAF</i>	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384		<i>eaeA</i>	
<i>eaeAR</i>	CCACCTGCAGCAACAAGAGG				
<i>S139F</i>	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGG	284	<i>Salmonella</i>	<i>invA</i>	Shanmugasam et al. (2011)
	CAA		spp.		
<i>S141R</i>	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC				

Fonte: Dados da autora

O DNA extraído foi submetido a PCR com aproximadamente 50 ng de DNA molde, 100 nM de cada um dos desoxinucleotídeos, 5 ul de tampão 10X, 75 mmol/L MgCl₂, 20 pmol/L de cada oligonucleotídeo iniciador (*primers*) e 2,5 U de Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) (RIBEIRO JUNIOR et al., 2016).

As condições de amplificação dos genes *eaeA*, *stx1* e *stx2* foram as mesmas descritas por Paton e Paton (1998): 35 ciclos de PCR, cada um consistindo em 1 min de desnaturação a 95°C; 2 min de anelamento a 65°C durante os primeiros 10 ciclos, decaimento a 60°C por ciclo até o ciclo 15; e 1,5 min de extensão a 72 °C, incrementando a 2,5 min nos ciclos 25 a 35. Os produtos da reação de PCR foram sujeitos a eletroforese em géis de agarose a 2%, coradas com brometo de etídio e fotodocumentados.

Para a pesquisa *Salmonella* spp., foi realizada uma reação de PCR gênero-específica utilizando o gene *invA*, conforme a metodologia proposta por Shanmugasamy, Velayutham e Rajeswar (2011). As condições de realização dos ensaios de PCR foram as mesmas descritas anteriormente (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2016). Os *primers* utilizados foram os *S139* e *S141* conforme representados anteriormente no quadro 3.

As condições de amplificação dessa reação foram: um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 1min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, anelamento a 64°C por 30 seg e extensão a 72°C por 30 seg; e, um ciclo de extensão final a 72°C por 7 min (SHANMUGASAMY, VELAYUTHAM, RAJESWAR, 2011). Os produtos de DNA

amplificados a partir de PCR para *Salmonella* spp. foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 2%, corados em brometo de etídio e visualizadas por iluminação UV. Uma escala de DNA de 100 pb foi usada como um marcador de peso molecular para produtos de PCR.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas 33 amostras de pescados frescos, destas 49% (16/33) eram provenientes de supermercados, 12% (4/33) de peixarias e 39% (13/33) de feiras livres. A tabela completa com o resultado das análises microbiológicas consta como anexo 2.

As condições e os estabelecimentos em que as amostras foram adquiridas foram observadas. Tratando-se das feiras, a maioria dos pescados não estavam no gelo, apenas em caixas de isopor sujas com restos de sangue e água. Observou-se também o local, utensílios de manipulação como facas e tábuas, falta de uso de luvas e avental sujo, conforme representado na figura 2. Todos esses fatores contribuem para a contaminação do pescado.

As feiras livres acontecem todos os finais de semana em diferentes lugares da cidade de Araguaína/TO. Aos sábados ocorrem no mercado municipal, local onde encontram-se também as peixarias que funcionam durante a semana. Aos domingos as feiras distribuem-se em três bairros. Em todas foi possível perceber as mesmas condições inadequadas de higiene, presença de insetos, comerciantes e consumidores manuseando e falando próximo aos peixes.

Figura 2 – Feirante manipulando pescados em feira livre na cidade de Araguaína/TO



Fonte: arquivo pessoal

Dados semelhantes foram encontrados por Dias, Cunha e Cardoso (2004) em estudo realizado em uma feira de Salvador- BA. Em 21 pontos de vendas, foram observadas inadequadas práticas de higiene para comerciantes e os pescados estavam expostos à temperatura ambiente.

A comercialização de alimentos, principalmente os pescados, é uma atividade que necessita cautela pois são altamente perecíveis. As ações da vigilância sanitária são de extrema importância para assegurar aos consumidores produtos com boa qualidade higiênico-sanitária (XAVIER et al., 2009).

Em grande parte dos supermercados e peixarias os atendentes portavam aventais, gorros e os pescados estavam em contato com bastante gelo. Entretanto, a figura 3 ilustra um supermercado no qual os pescados estavam armazenados com poucas quantias de gelo, mas dentro de uma câmara fria, porém esta ficava sendo aberta frequentemente. É possível sugerir que a temperatura para esses pescados não estava adequada, uma vez que a prática de abrir a câmara fria permite a troca de calor e conseqüentemente possibilita que a temperatura oscile.

Figura 3 – Pescados comercializados com poucas quantias de gelo em supermercado na cidade de Araguaína/TO



Fonte: arquivo pessoal.

A manutenção de baixas temperaturas é um fator importante para a durabilidade do pescado. Quando estocado em gelo, o pescado deve ser manipulado o mínimo possível. A refrigeração retarda as reações químico-enzimáticas envolvidas no processo de autólise

(SANTOS; COELHO, 2016). Entretanto, essas informações são contrárias a tudo que foi observado durante a pesquisa, pois todos os pescados eram frequentemente manipulados pelos comerciantes que ao oferecer o produto, os retiravam do gelo para mostrar ao consumidor e esse processo se repetia até a escolha do alimento.

Para Vieira et al. (2003) a refrigeração contribui com o período de vida útil dos pescados e possibilita que estes produtos estejam disponíveis em locais distantes daqueles de captura. Para isso, é fundamental que os pescados estejam com sua microbiota contaminante dentro dos limites preconizados pela legislação, sob pena de não poderem ser comercializados e ou exportados (MOURA et al., 2003).

A conservação dos pescados é um desafio, visto que suas propriedades biológicas favorecem a sua rápida deterioração e quando associado a inadequadas práticas de captura, processamento e/ou beneficiamento podem contribuir para a contaminação do produto. Estabelecimentos devem zelar pela segurança e qualidade do pescado e uma das formas é atenção com o armazenamento.

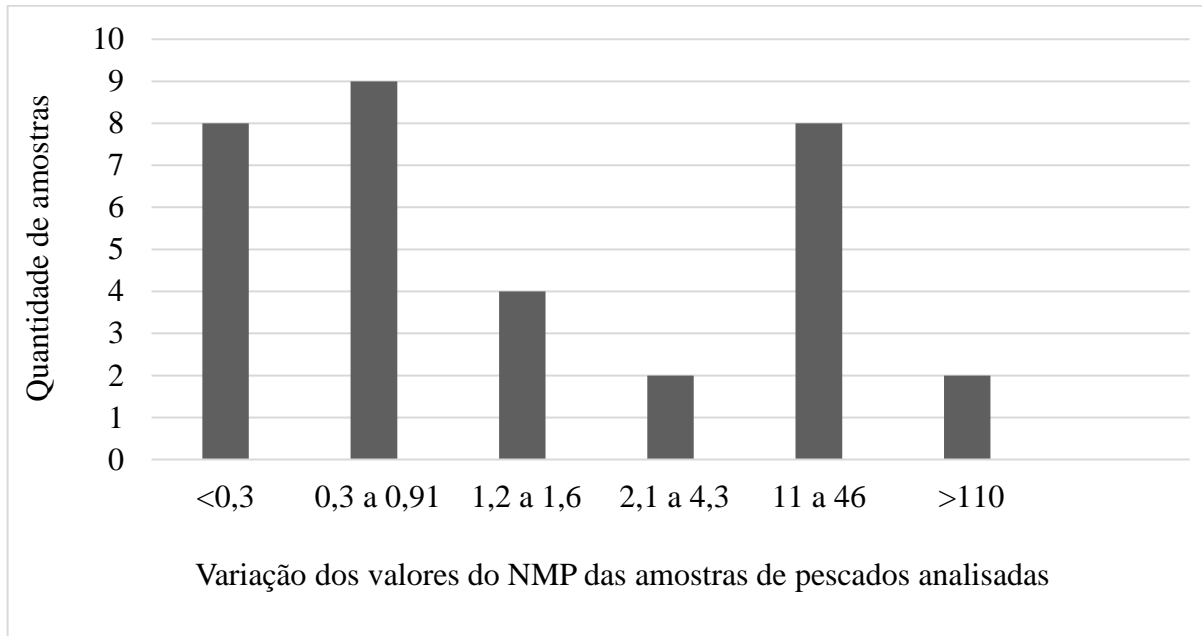
Durante a pesquisa foi possível observar que os pescados de supermercados e peixarias ficavam estocados no gelo por várias horas ou dias, diferentemente da feira que rapidamente eram esgotados devido elas acontecerem apenas aos finais de semana e terem grande procura pela população. Os demais estabelecimentos adquirem grandes quantidades do produto e estes demoram a serem vendidos, e só a partir disso, que são repostos novos pescados. Portanto, essas condições permitem maiores chances de proliferação de microrganismos psicrófilos, além de estarem suscetíveis a contaminações cruzadas devido ao tempo de exposição do produto.

4.1 Contagem coliformes termotolerantes

A contagem de coliformes termotolerantes foi realizada nas 33 amostras de pescados frescos coletadas e os resultados estão organizados no gráfico 1. A legislação brasileira designada pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) de nº 12 de 02 de janeiro de 2001 não impõe parâmetros para a contagem desses microrganismos em peixes *in natura*, entretanto, servem como indicadores de qualidade, pois podem estar associados à microrganismos enteropatogênicos.

Das 33 amostras, 93,9% (31/33) tiveram variações entre $<0,3$ e 46 NMP/mL e 6,06% (2/33) amostras apresentaram contagens >110 NPM/mL. Tais dados indicam condições higiênico-sanitárias precárias da comercialização dos peixes.

Gráfico 1. Número Mais Provável de Coliformes Termotolerantes de pescados frescos comercializados na cidade de Araguaína/TO



Fonte: dados da autora

Estudo realizado por Palha (2015) contribui para esses dados, uma vez que de 30 amostras de peixes frescos analisados no município de Macapá-AP, 86,6% (26/30) tiveram NMP de coliformes > 110.

Segundo Agnese et al. (2001) valores de coliformes acima de 50 a 100 NMP por grama de carne de pescado, é motivo suficiente para realizar um controle mais rígido relacionado a higiene de beneficiamento e comercialização do produto.

Nesta pesquisa, as duas amostras insatisfatórias na contagem de coliformes termotolerantes eram provenientes de feiras. A preocupação com este comércio informal é constante, devido suas condições higiênicas inadequadas de venda e armazenamento dos alimentos.

Uma pesquisa realizada por Santos e Coelho (2016) no município de Palmas com pescados frescos provenientes de feira, verificaram elevada presença de coliformes termotolerantes. Das 27 amostras de pacu-caranhas, 14,8% (4/27) estavam com contagem >1100 NMP/g.

Uma pesquisa realizada por Santos e Coelho (2016) no município de Palmas com pescados frescos provenientes de feira, verificaram elevada presença de coliformes

termotolerantes. Das 27 amostras de pacu-caranhas, 14,8% (4/27) estavam com contagem >1100 NMP/g.

Apesar da RDC nº 12 vigente não impor limites para o número de coliformes termotolerantes nos pescados *in natura*, a Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF,1986) regulamenta a quantidade máxima de 10^3 NMP/g para esse tipo de produto (PALHA, 2015).

Uma amostra com número elevado de termotolerantes também estava contaminada com *Salmonella* spp. O mesmo aconteceu com pesquisa relatada por Palha (2015), 16,6% (5/30) das amostras positivas para o microrganismo também tiveram altas contagens desses coliformes. Essas informações mais uma vez sugerem as inadequadas condições higiênicas da comercialização das amostras.

As amostras que tiveram estes índices altos estavam ausentes de *E. coli*. De acordo com Soares et al. (2011) pescados com esses dados sugerem que houve contaminação secundária, seja por meio da manipulação, armazenamento ou refrigeração em condições higiênicas inadequadas. Os coliformes termotolerantes além de estarem presentes em fezes humanas e de animais homeotérmicos, ocorrem em solos, plantas ou outras matrizes ambientais (PALHA, 2015).

O mesmo aconteceu no trabalho de Santos (2014) que teve uma amostra com coliformes termotolerantes >1100 e ausência de *E. coli*. Farias e Freitas (2008) analisaram 133 amostras de pescados provenientes de uma indústria paraense, destes, 6,02% (8/133) amostras tiveram contagens elevadas de coliformes termotolerantes e ausência de *E. coli*.

É importante ressaltar que Farias e Freitas (2008) não trabalharam com amostras de pescados informais, mas sim de uma indústria, o que se comporta como alarmante para a saúde pública, pois entende-se que o processamento foi realizado por pessoas capacitadas em ambiente inspecionado.

As amostras de pescados analisadas neste trabalho provenientes de peixarias e supermercados apresentaram níveis toleráveis da contagem desses microrganismos. Entretanto, os resultados da contagem de psicotróficos e da pesquisa de *Salmonella* spp e *E. coli* que serão discutidas posteriormente não permitem afirmar a qualidade higiênico-sanitária e segurança microbiológica destes pescados frescos, portanto, contagem destes microrganismos servem apenas como indicadores sanitários.

O estudo realizado por Gatti Júnior (2011) mostrou que das 10 amostras, 20% (2/10) tiveram número elevado de coliformes termotolerantes na água utilizada no enxague do peixe.

O autor afirma que tal fato pode estar relacionado com o grau de exposição que a pele tem com o ambiente e isso pode tornar o produto suscetível a contaminações cruzadas.

Os pescados frescos podem ser mais procurados pela população por apresentarem custos atrativos. Também é possível levar em consideração a cultura local que pode permitir que os consumidores considerem o alimento mais saudável por ser fresco. Entretanto, muitas pessoas desconhecem ou desconsideram os riscos à saúde caso o alimento esteja contaminado e venha a ser consumido malcozido ou até mesmo cru. Devido a isso, entende-se a importância da inspeção de alimentos e maior cautela na fiscalização sanitária dos produtos.

4.2 Contagem de bactérias psicrotróficas

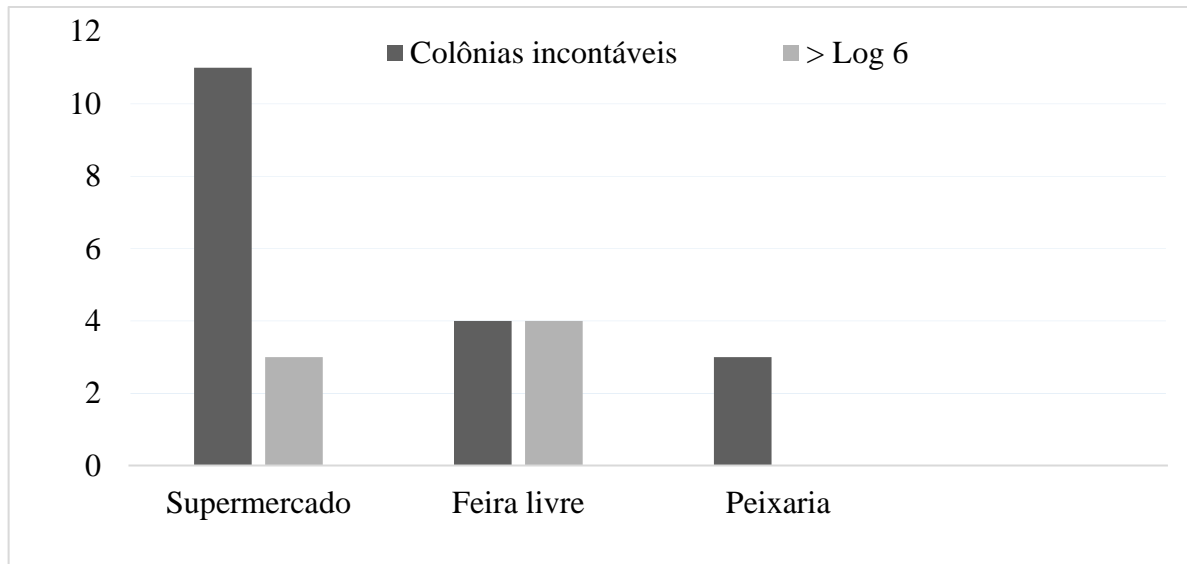
Na legislação vigente RDC nº 12/2001 não existe limite de colônias de psicrotróficos (UFC/mL) nos alimentos. Entretanto, a quantidade presente destes, indica contaminação geral do alimento e sua qualidade, estado de conservação e vida de prateleira (SILVA et al., 2007).

Grande parte dos animais aquáticos no ato de captura tem contagens de 2 a 5 log de UFC/g. A crescente contagem padrão em placa em níveis superiores ao de 6 log UFC/g normalmente indica duradouro período de armazenamento em temperaturas frias (ARGÔLO, 2012). A ICMSF (1986) preconiza que contagens de psicrotróficos em pescados frescos não podem ultrapassar 6 logs UFC/g.

A análise dos microrganismos psicrotróficos foi realizada através da contagem de colônias. Portanto, das 33 amostras, 75,7% (25/33) foram consideradas insatisfatórias, visto que 54,5% (18/25) apresentaram incontáveis colônias e 21,1% (7/25) tiveram contagens de colônias acima de log 6. Tratando-se do tipo de estabelecimentos envolvidos nessas amostras insatisfatórias, 42,4% (14/25) eram provenientes de supermercados, 9,09% (3/25) de peixarias e 24,2% (8/25) de feiras livres, conforme gráfico 2.

Palha (2015) em suas análises com 30 pescados coletados em feiras na cidade de Macapá, 6,6% (2/28) tiveram valores iguais ou superiores a log 6 para psicrotróficos. Estudos realizados por Soares et al. (2011) com filés de peixes congelados comercializados na cidade de Botucatu –SP, verificaram que as contagens de psicrotróficos variaram entre 0 e 9,1 logs UFC/g. Tais dados, assim como do presente trabalho, não indicam boa qualidade dos pescados avaliados.

Gráfico 2 – Amostras de pescados insatisfatórias para contagem de microrganismos psicrotróficos comercializados na cidade de Araguaína/TO



Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com Fornari et al. (2017) os pescados são adquiridos em maior parte em supermercados. Isso pode acontecer devido a facilidade de compra, sem precisar direcionar-se às feiras ou peixarias apenas para comprar o peixe.

Foi possível perceber que os supermercados tiveram a maioria dos dados insatisfatórios, pois apresentaram 42,4% (14/33) das amostras de pescados com contagens de psicrotróficos elevadas. Esses resultados indicam que os pescados estão estocados em grandes quantidades de gelo, o que é uma prática adequada, entretanto, elevadas contagens desses microrganismos podem indicar período duradouro de armazenamento e podem estar relacionadas com a qualidade do produto.

De acordo com Batista et al. (2004) em pescados conservados em gelo, as bactérias psicrotróficas tem maior participação no processo de deterioração do alimento. Para Massaguer (2005) a contagem de bactérias psicrotróficas serve para avaliar o grau de contaminação dos alimentos refrigerados.

O gelo também está diretamente relacionado à qualidade higiênica dos pescados, pois quando empregado de maneira correta e quantidade adequada ele contribui para a conservação do peixe (GHALY et al., 2010). Porém, nem sempre o gelo utilizado para esse fim apresenta

qualidade e quantidade satisfatória, o que corrobora para contaminação do pescado durante o resfriamento (SCHERER et al., 2004).

Tais análises sugerem que medidas para melhorar a qualidade dos pescados comercializados devem ser tomadas, dentre elas, especial atenção na conservação do produto e tempo de prateleira, uma vez que se tratam de alimentos informais, sem inspeção, com maiores riscos de causar DTA's aos consumidores. A conscientização dos consumidores quanto aos possíveis problemas ocasionados por estes alimentos também serve como medida de precaução e segurança microbiológica destes produtos.

4.3 Pesquisa de *Escherichia coli*

Tratando-se da pesquisa de *E. coli*, foram positivas bioquimicamente 9,09% (3/33) das amostras de pescados analisadas, tais dados estão organizados na tabela 1. Todas as colônias com morfologia compatível com o micro-organismo esperado foram re-isoladas para realização de testes confirmatórios por biologia molecular. Uma mesma amostra foi positiva tanto para *E.coli* como para *Salmonella* spp. Das amostras de pescado positivas, em 3 delas foram isoladas 5 colônias de *E. coli*, conforme caracterização bioquímica.

As 5 colônias positivas foram submetidas a pesquisa dos genes que codificam os fatores de virulência de *E. coli*: *eaeA*, *stx1* e *stx2*, que caracterizam EPEC e STEC, respectivamente. A pesquisa de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) foi realizada indiretamente pela pesquisa da presença simultânea dos genes *eaeA* e *stx1* ou 2. Essa pesquisa gênica foi negativa para os isolados, ou seja, nenhuma cepa de *E. coli* foi patogênica, sendo portanto, todas comensais.

Tabela 1 – Amostras caracterizadas como *E. coli* nos testes bioquímicos e negativas para genes de virulência *eaeA*, *stx1* e *stx2*

Amostra	Tipo de estabelecimento	Quantidade de colônias de <i>E. coli</i>	Identificação de fatores de virulência (PCR)
1	Supermercado	2	Negativo
2	Supermercado	2	Negativo
5	Peixaria	1	Negativo

Fonte: Arquivo pessoal

Quando se trata da *E. coli*, a resolução RDC nº 12/2001 não menciona a quantidade permitida para ser encontrada nos pescados, entretanto, esse microrganismo mesmo que não tenha genes patogênicos, indica contaminação de origem fecal e possível presença de outros

enteropatógenos como a *Salmonella* spp. (ARGÔLO, 2012). É importante ressaltar que a amostra denominada como número “2” teve presença de ambas enterobactérias, o que reforça essa relação da *E.coli* com agentes que podem vir a causar DTA's.

A presença de *E. coli* nos alimentos é considerada um indicador de contaminação fecal direta ou indireta. A contaminação direta ocorre durante o processamento do pescado e devido à falta de higiene pessoal dos manipuladores. A contaminação indireta pode ocorrer através de águas poluídas e de esgoto, seja no processamento do pescado ou no cultivo (PALHA, 2015).

Paiva (2016) isolou *E. coli* em todas as 54 amostras de águas e peixes coletados no rio Mearim na cidade de Bacabal-MA. Estes dados corroboram para esta pesquisa, mesmo que as amostras encontradas não sejam patogênicas, serve como alerta sanitário da forma que o produto está sendo oferecido aos consumidores nesses estabelecimentos, ou seja, apresentam contaminação de origem fecal.

De acordo com Argôlo (2012) a extensão da cadeia produtiva do pescado e a natureza informal desta atividade econômica possibilita que a contaminação por *E. coli* ocorra ao longo de toda produção, desde a obtenção do produto até o momento da comercialização.

Barbosa (2013) ao pesquisar *E. coli* em tilápias *in natura* detectaram a presença do microrganismo em 90% (9/10) das amostras coletadas, mas não se tratavam de cepas patogênicas. Os autores consideraram que o resultado pode estar relacionado com a contaminação durante o beneficiamento do pescado.

Tratando-se dos tipos de comércios que tiveram amostras positivas para *E. coli*, os supermercados apresentaram-se insatisfatórios em 66,6% (2/3) das amostras, enquanto em peixaria apenas uma amostra foi positiva 33,3% (1/3). Em relação a feira, não houve amostra positiva para o microrganismo. Pesquisa realizada por Pao et al. (2008) com peixes provenientes de supermercados no estado da Virginia nos Estados Unidos, foram encontradas *E. coli* em 21,7% (59/272) das amostras.

Independente do estabelecimento, os dados são preocupantes, uma vez que 30% (10/33) dos pescados frescos adquiridos mostraram-se em condições insatisfatórias de consumo, devido à presença de *Salmonella* spp. e/ou *E. coli*. Ressalta-se a importância de os pescados não serem consumidos malcozidos ou crus devido à presença desses microrganismos.

Esses alimentos têm grande procura por serem vendidos frescos, o que economicamente os tornam mais acessíveis. É importante ressaltar que no estado do Tocantins o hábito de comer peixes é frequente, ou seja, faz parte da cultura da população. Para que estes alimentos cheguem ao consumidor com condições sanitárias satisfatórias, deve haver parceria de órgãos

competentes com propósito de fiscalização e capacitação de toda cadeia produtiva para a venda do produto, de modo que os benefícios do consumo dos pescados sejam aproveitados.

Optar por produtos inspecionados permitem maior segurança alimentar, uma vez que se ocorrer casos de DTA's, a empresa responsável pela inspeção dos produtos pode ser questionada e induzida a reparar os danos, algo que não é possível de acontecer no comércio informal.

4.4 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Na pesquisa de *Salmonella* spp. 24,2% (8/33) das amostras foram positivas para o gênero. Todas as colônias com morfologia compatível com o micro-organismo esperado foram re-isoladas para realização de testes confirmatórios por biologia molecular. Portanto, das 8 amostras, foram isoladas 26 colônias sugestivas de *Salmonella* spp. Os dados são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Amostras positivas para *Salmonella* spp.

Amostra	Tipo de estabelecimento	Quantidade de colônias positivas isoladas
2	Supermercado	5
6	Peixaria	2
9	Supermercado	3
14	Supermercado	1
16	Supermercado	9
17	Supermercado	1
20	Peixaria	4
22	Feira	1

Fonte: dados da autora

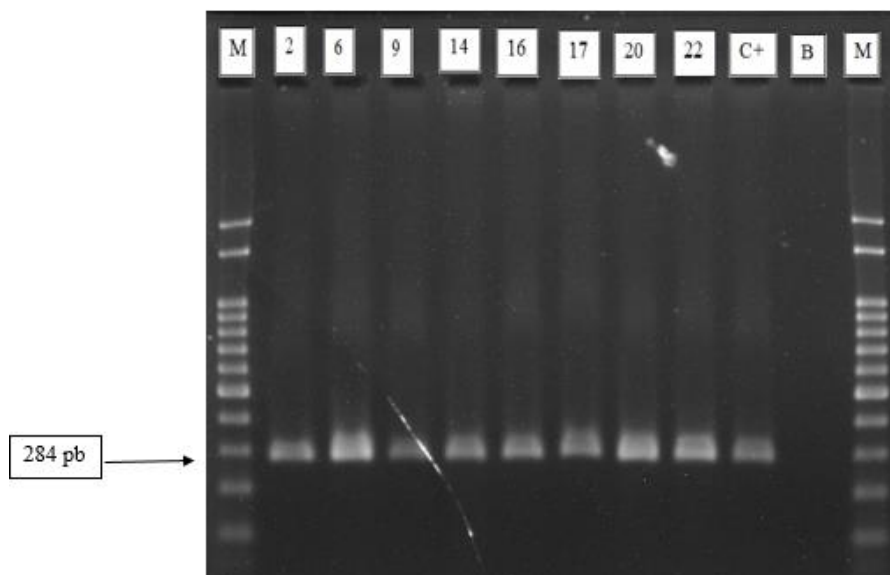
A legislação brasileira RDC nº 12/2001 – afirma que o gênero *Salmonella* não deve ser encontrado em 25g de alimentos, caso isso aconteça, o alimento está impróprio para o consumo (BRASIL, 2001). Portanto, 24,2% (8/33) das amostras de pescados analisadas não deveriam estar sendo comercializadas, pois pode colocar em risco à saúde do consumidor devido à presença de *Salmonella* spp.

De acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde, entre os anos de 2007 e 2016 foram notificados 6.632 surtos de DTA's. O pescado encontrou-se na 14ª posição entre os alimentos veiculadores. Os principais patógenos responsáveis foram *Salmonella* spp., *E. coli* e *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2016).

A *Salmonella* spp. é considerada uma das principais responsáveis por causar as DTA's (POPOFF; LE MINOR, 2005). Embora todos os sorotipos de *Salmonella* spp. devam ser considerados como potenciais patógenos, apenas um número limitado deles é responsável por infecção em humanos e animais. A grande maioria dos surtos de DTA's tem como responsável o agente *S. Typhimurium* (TAVECHIO, 2006).

Todas as 26 colônias encaminhadas para diagnóstico gênero específico de *Samonella* foram positivas para o gene *invA*, representado na Figura 4.

Figura 4– Leitura positiva da PCR do gene *invA* para os microrganismos caracterizados como *Salmonella* spp. isolados de pescados



Legenda: M: Marcador de peso molecular de 1kb em escala crescente de 100 pb; Números de 2 a 22 representam as amostras de pescados positivas para o gene *invA* de *Salmonella* spp; C+: controle positivo do gene *invA*; B: controle negativo para o gene; 248 pb: tamanho do fragmento do gene *invA* esperado.

A presença de *Salmonella* spp. em peixes frescos comercializados em feiras livres na cidade de Palmas-TO foi relatada por Santos e Coelho (2016). Das amostras analisadas 5,88% (3/51) foram positivas para o microrganismo. Em contrapartida, na presente pesquisa 62,5% (5/8) dos pescados positivos para esse microrganismo foram provenientes de supermercados.

A literatura não traz tanta preocupação com a comercialização dos pescados frescos em grandes supermercados. Acredita-se que seja pelo fato de serem locais fechados com aparência de higienização dos pisos, bancadas, vestimenta adequada dos funcionários, uso de luvas e gorros e tratarem-se de um comércio formal.

Análises realizadas por Palha (2015) com peixes comercializados em feiras na cidade de Macapá-AP, apresentaram como resultados 16% (5/30) de amostras positivas para esse

microrganismo. Ao avaliar a qualidade microbiológica de pescado de feiras livres e supermercados de Maceió-AL, Silva et al. (2002) também encontraram *Salmonella* spp. em 25% (15/60) das amostras analisadas.

Existe muita atenção com o comércio de alimentos em feiras livres e mercados municipais, isso se dá ao fato do grande fluxo de pessoas, alimentos expostos em barracas e normalmente desprovidos de estrutura para higienização de mãos e utensílios (JHA; ROY, BARAT, 2010). Foi possível observar durante a pesquisa essas condições higiênicas insatisfatórias, no entanto, essas condições não influenciaram no maior risco do produto proveniente da feira em relação ao supermercado.

As amostras positivas para esses microrganismos são consideradas impróprias para o consumo e indicam precárias condições higiênicas na cadeia produtiva dos pescados. Durante a coleta das amostras foi possível observar que os peixes das feiras eram armazenados em caixas de isopor sujas, sem gelo, com presença de sangue, além do comerciante manipular o produto sem luvas e vestimenta adequada, e ao mesmo tempo era responsável pelo dinheiro das vendas, sem higienização das mãos. Devido a isso, esperou-se que os pescados provenientes de feiras seriam os de maior risco com presença de enteropatógenos.

Portanto, as amostras de pescados frescos provenientes de supermercados apresentaram maior perigo microbiológico para saúde pública devido à presença de *Salmonella* spp. Isso sugere a necessidade imediata de atenção com higiene durante todo processo de comercialização destes produtos, além destes não serem consumidos crus ou malcozidos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível perceber que uma parcela das amostras analisadas apresentou condições higiênicas insatisfatórias, má qualidade e com risco à saúde dos consumidores. A presença de *Salmonella* spp. nos pescados analisados foi constatada e trata-se de um dado alarmante, visto que o consumo destes alimentos crus ou malcozidos contaminados pode acarretar DTA's.

O comércio de pescados frescos, seja formal ou informal, apresenta grande procura pela população e acredita-se que faça parte da cultura local, entretanto, ambos apresentaram riscos à saúde dos consumidores.

Os pescados são altamente perecíveis e as análises microbiológicas para assegurar a qualidade destes produtos requer tempo, no entanto, estes produtos são comercializados e consumidos rapidamente. Portanto, a fiscalização sanitária de toda cadeia produtiva deve ser somada a sensibilização dos vendedores e consumidores sobre as boas práticas higiênico-sanitárias como forma de prevenção dos riscos à saúde, pois estes são fatores primordiais para evitar os surtos alimentares.

6 REFERÊNCIAS

- AFSET, J. E.; BEVANGER, L.; ROMUNDSTAD, P. et al. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhea. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, p.1137–1144, 2004.
- AGNESE, A. P.; OLIVEIRA, V. M.; SILVA, P.P.O.; SILVA, P. P. O.; OLIVEIRA, G. A. Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e enumeração de coliformes totais e fecais, em peixes frescos comercializados no município de Seropédica - RJ. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 88, p. 67-70, 2001.
- ALMEIDA, E. R.; MENDES, S. H. A. A criação de peixe no Tocantins: a contribuição da piscicultura para o desenvolvimento local. **Revista São Luís Orione Online**, v. 2, n. 9, p. 20-33, 2015.
- ARANDA, K. R. S.; FAGUNDES, U.N.; SCALETSKY, I.C.A. Evaluation of Multiplex PCRs for Diagnosis of Infection with Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 12, p. 5849-5853, 2004.
- ARGÔLO, Simone Vieira. **O beneficiamento e o comércio informal de pescados em São Francisco do Conde-BA: o trabalho, a higiene e a conservação do produto**. 2012. 105f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2012.
- BACCARIN, A. E. et al. Piscicultura em comunidade remanescente de quilombo: um estudo de caso. **Informações Econômicas**. v.39, n.11, p. 42-47, 2009.
- BARRETO, N. S. E. et al. Avaliação das condições higiênico-sanitárias do pescado comercializados no município de Cruz das Almas, Bahia. **Revista Caatinga**. v. 25, n.3, p. 86-95, 2012.
- BARBOSA, M. M. C. **Qualidade higiênico-sanitária e ocorrência de *Aeromonas sp.* e *Escherichia coli* em tilápias comercializadas no varejo**. 2013. 104f. Tese. Universidade Estadual Paulista, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. Jaboticabal, 2013.
- BARROS, A. F. et al. Caracterização da piscicultura na microrregião da baixada Cuiabana, Mato Grosso, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**. v.37, n.3, p. 261-273, 2011.
- BATISTA, G. M. et al. Alterações bioquímicas *post-mortem* de matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) procedente da piscicultura, mantido em gelo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.24, n.4, p. 573-581, 2004.
- BERTÃO, A. M. S.; SARIDAKIS, H. O. *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. **Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 28, n.2, p. 81-92, 2007.
- BLEICHER, A. et al. The plasmidome of *Salmonella enterica* serovar Derby isolated from pork meat, **Plasmid**. v.69, n.3, p. 202-10, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. **Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos**. Brasília, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Brasil. **Resolução nº12, de 02 jan 2001**. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Brasília: Diário Oficial da União, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RDC no12 de 2 de janeiro de 2001**. 1. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b> Acesso em 24 de setembro de 2018

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar – UVHA**. Brasília: Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar; 2016. 19p

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp.** Brasília, 2011. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/manual-diagnostico-salmonella-spp-web.pdf>> Acesso em 26 de setembro de 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Brasília, 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/02/Apresentacao-Surtos-DTA-Junho-2018.pdf>> Acesso em 26 nov 2018

BRITO, B. G. et al. Fatores de virulência presentes em amostras de *Escherichia coli* uropatogênicas – UPEC para suínos. **Ciência Rural**. v.34, n.2, p. 645-652, 2004.

BROOKS, G. F. et al. **Microbiologia médica**. 24ª Edição. Mc-Graw Hill Interamericana do Brasil Ltda, Rio de Janeiro, 2009.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Divulgação técnica – *Salmonella* na segurança dos alimentos. **Biológico**. v. 70, n1, p. 11-13, 2008.

CASTRO, A. P. P. **Avaliação das condições higiênico-sanitárias e análise de parâmetros microbiológicos e físico-químicos do pescado importado no porto de Santos/SP**. 2016. 72 f. Dissertação. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

COURA, F. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 811–818, 2014.

DEAN, A.G.; SULLIVAN, K. M.; SOE, M. M. **OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health**, Versão. www.OpenEpi.com, atualizado 2013/04/06. Disponível em: <https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm> Acesso em 18 de março de 2018.

DIAS, J.C.; CUNHA, C.L.; CARDOSO, R.C.V. Segurança alimentar e a comercialização de pescados na Feira de São Joaquim, Salvador-BA. *In: Anais do XXIII Seminário Estudantil*

de Pesquisa, 2004, Salvador. Resumos. Salvador: Universidade Federal da Bahia, 2004. p. 146-146.

DIAS, Mariana Tavares. “**Caracterização genotípica e avaliação da susceptibilidade antimicrobiana de cepas patogênicas de *Escherichia coli* isoladas de queijo minas frescal**”. 2011. 118 f. Tese. Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ). Rio de Janeiro, 2011.

DRUMOND, S. N. et al. Identificação molecular de *Escherichia coli* diarreiogênica na Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó na região do Alto Rio Doce. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v.23, n.3, p.579-590, 2018.

EMBRAPA. **Criação de peixes pode ser uma boa alternativa de negócio para o produtor rural brasileiro**. Aracajú, 2010. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1014623/1/Criacaodepeixes.pdf>> Acesso em 18 fev 2019.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges**. Rome: FAO, 2016. 243 p

FARIA, Adriana Marques. **Genes de virulência em *Salmonella enterica*: Descrição, componentes estruturais e métodos de detecção**. 2013. 43 f. Seminário aplicado - doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013. 43 f.

FARIAS, M. C. A.; FREITAS, J. A. Qualidade microbiológica de pescado beneficiado em indústrias Paraenses. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n.2, p. 113-117, 2008.

FERREIRA, E. O.; CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTHERNUM, F. **Microbiologia**. 5.ed. Editora Atheneu. São Paulo, 2008.

FILGUEIRA, B. N. N. **Avaliação das alterações microbiológicas do peixe voador (*Hirundichthys affinis*) durante o período de armazenamento em gelo**. 2017. 37 f. Monografia (Curso de Nutrição). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2017.

FLORES, R. M. V; CHICRALA, P. M; SOARES, S. S. Avaliação das preferências dos consumidores de pescado do estado do Tocantins através de pesquisa de campo realizada no seminário caiu na rede é lucro. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**. v. 18, n.1, p. 121-129, 2014.

FORNARI, C, A, C. et al. Estudo sobre os hábitos alimentares e de consumo de pescado da população de Palmas (TO). **Revista Desafios**. v. 4, n.4, p. 137-142, 2017.

FRANCO, B. D. G. M; LANGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. Editora Atheneu, São Paulo, 2003.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. Editora Atheneu, São Paulo, 2008.

- GALVÃO, J. A. et al. **Qualidade e processamento de pescado**. Elsevier Editora. 1ª Edição, Rio de Janeiro, 2014.
- GATTI JÚNIOR, Pedro. **Qualidade higiênica e sanitária de tilápias provenientes de cultivo, comercializadas no varejo**. 2011. 58 f. Dissertação. Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, 2011.
- GHALY, A. et al. Fish spoilage mechanisms and preservation techniques: review. **American Journal of Applied Sciences**. v.7, n.7, p. 859-877, 2010.
- GOUFFAUX, F. et al. “**Effacement (LEE) of**”. Mechanisms in the Pathogenesis of Enteric Diseases, n.2, v.473, p. 129, 2012.
- GUZMÁN, M. C.; BISTONI, M. A.; TAMAGNINI, L. M.; GONZÁLEZ, R. D. Recovery of *Escherichia coli* in fresh water fish, *Jenynsia multidentata* and *Bryconamericus iheringi*. **Water Research**, v. 38, p. 2368-2374, 2004.
- HARVARD, University Dining Services. **Food pyramids: what should you really eat**. 2012. Disponível em: <<https://cdn1.sph.harvard.edu/wp-content/uploads/sites/30/2012/10/healthy-eating-pyramid-huds-handouts.pdf>> Acesso em 20 nov 2018.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. **Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications**, 2. ed. London: Blackwell Scientific Publications, 1986.
- JAY, J. M. **Microbiologia dos alimentos**. 6ª Edição, Editora Artmed, Porto Alegre, 2005.
- JHA, P; ROY, R. P; BARAT, S. Applications of sensory and microbial analysis to assess quality of fish in Siliguri city of West Bengal, India. **Journal of Environmental Biology**. v.31, n.5, p. 587-594, 2010.
- JULIO, Ingrid Gianotti. **Redes de comercialização de peixes *in natura* nas Feiras Livres municipais de Palmas – TO**. 2015. 104 f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, TO, 2015.
- KAYE, D. *Salmonella* infections other than typhoid fever. In: GOLDMAN, L.; BENNETT, J.C. **Cecil textbook of medicine**. 21. ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2010.
- KAWANO, K.; et al. Relationship between stx Genotype and Stx2 Expression Level in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 Strains. **Japanese Journal of Infectious Diseases**. v. 65, n. 4, p. 322-325, 2012.
- LIMA, Consuelo Lúcia Sousa de. **Avaliação dos perigos microbiológicos em uma indústria de beneficiamento de pescado e sugestão de um sistema de gestão de qualidade**. 2012. 128 f. Tese. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.

- LIMA, M. G.; REIS, R. B. Incidência de *Salmonella* spp. Comparação entre metodologias de detecção em amostras de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) de rio e cultivado comercializadas no município de Cuiabá - MT. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 101, p. 43-49, 2002.
- LOPES, I, G; OLIVEIRA, R. G; RAMOS, F.M. Perfil do consumo de peixes pela população brasileira. **Biota Amazônia**. v. 6, n. 2, p. 62-65, 2016.
- MACIEL, Karina Almeida. **Fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de aves abatidas no estado do Tocantins**. 2016. 66 f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical. Universidade Federal do Tocantins, Araguaína - 2016.
- MADIGAN, M. T.; et al. **Microbiologia de Brock**. Editora Artmed. 12ª Edição. Porto Alegre, 2010. 1160 pág.
- MARTINS, Caio Willian de Santana. **A comercialização de peixes em feiras públicas, nos municípios de Feira de Santana e Cruz das Almas, Bahia**. 2015. 41 f. Monografia (Curso de Engenharia de Pesca). Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2015.
- MARTINS, M. L., et al. Detecção de Proteases Bacterianas em Leite por Métodos Imunológicos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 59, n. 339, p.61, 2004.
- MASSAGUER, P.R. **Microbiologia dos processos alimentares**. Livraria Varela. 1 ed. São Paulo: 2005.
- MENDONÇA, E. P. **Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil**. 2016. 134 f. Tese. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia. 2016.
- MENDONÇA, E. P. **Disseminação de *Salmonella* spp. na cadeia produtiva de frango de corte**. 2011. 184 f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia. 2011.
- MINE, Y. Controle e prevenção de *Salmonella* Enteridis em frangos e ovos. **Ave world: Os 10 + na carne de frango**. v. 3, n1, p. 34-35, 2005.
- MOURA, A.F.P.; MAYER B.D.M.; LANDGRAF, M.; TENUTA, F.A. Qualidade química e Microbiológica de Camarão Rosa Comercializado em São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 3, n.39, p. 203-208, 2003.
- MURRAY, P. R; ROSENTHAL, K. S; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Elsevier Editora. 6ª Edição. Rio de Janeiro, 2009.
- NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, EUA, v.11, n.1, p. 142-201, 1998.
- OHL, M. E.; MILLER, S. I. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. **Annual Review of Medicine**. v. 52, p. 259-274, 2011.

OLIVEIRA, A. B. A.; et al. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista HCPA**, v.30, n.3, p. 279-285, 2010.

OLIVEIRA, A. P. *Salmonella enterica*: genes de virulência e ilhas de patogenicidade. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer, v.9, n.16, p. 1947-1972, 2013.

PALHA, Sandra Eliane Maia. **Avaliação microbiológica de peixes comercializados em feiras livres do município de Macapá /AP**. 2015. 50 f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Macapá, 2015.

PAO, S. et al. Microbial quality of raw aquacultured fish fillets procured from internet and local retail markets. **Journal of Food Protection**. v.71, n.8, p.1544–1549, 2008.

PATON, ADRIENNE W; PATON, JAMES C. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 598-602, 1998.

PINHEIRO, R.H.; BANDEIRA, A.L.; ROCHA. Comércio de pescado em mercado de bairro de Belém: Aspectos higiênico-sanitários. **IV Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica**. Belém-PA. 2009.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. E. The genus *Salmonella*. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Editors). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2 ed.; v.2, Springer, p. 764-799, 2005.

QUINN, P.J. et al. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. 1ª ed. **Editora Artmed**. Porto Alegre, 2005.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C. et al. Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 37, n. 5, p. 3069-3078, 2016.

SALES, P. V. G; CÓL, D.C; SOUZA, F. G. Avaliação da qualidade do fishburger de Caranha. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.15, p. 259-264, 2012.

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

SANTOS, A. A. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de sushi comercializado em restaurantes de Aracaju, Sergipe. **Scientia Plena**, v 8, n.3, p. 1-5, 2012.

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

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.21, n.4, p. 680-684, 2004.
- SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clin.Microbiol.Rev.** v. 17, n.1, p. 14-56, 2004.
- SCHULTER, E. P.; VIEIRA FILHO, J. E. R. **Evolução da Piscicultura no Brasil: Diagnóstico e Desenvolvimento da Cadeia Produtiva de Tilápia**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Rio de Janeiro, 2017. 42 p.
- SEAGRO. **Situação atual da aquicultura tocantinense**. Palmas, TO, 2018. Disponível em: < <https://central3.to.gov.br/arquivo/425909/>> Acesso em 18 fev 2019.
- SEBRAE. **Aquicultura no Brasil: série estudos mercadológicos**. Brasília, DF, 2015. Disponível em: < [http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/\\$File/5403.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/$File/5403.pdf)> Acesso em 18 fev 2019.
- SHANMUGASAMY, M; VELAYUTHAM, T; RAJESWAR, J. *InvA* gene specific PCR for detection of *Salmonella* from broilers. **Veterinary World**. v.4, n.12, p. 562-564, 2011.
- SHINOHARA, N. K. S. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência e Saúde coletiva**. v.13, n.5, p. 1683-2008, 2008.
- SILVA-JÚNIOR, A, C, S. et al. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes em Jaraqui, *Semaprochilodus brama* (Valenciennes, 1850) comercializado na Feira do Pescado, Macapá-AP. **Biota Amazônia**. v. 5, n. 1, Macapá,, 2015.
- SILVA, N. et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4ª Edição, Editora Varela. São Paulo, 2007.
- SOARES, V. M. et al. Qualidade microbiológica de filé de peixe congelados distribuídos na cidade de Botucatu-SP. **UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e Saúde**. v.13, n.2, p. 85-88, 2011.
- SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A. Qualidade e segurança do pescado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v. 71, n.1, p.1-10, 2012.
- SVAITER, M. A. B. et al. Sorovares de *Salmonella* isoladas de indivíduos com gastroenterite e portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Científica Internacional**. Edição 27, v.1, p. 22-34, 2013.
- TAVECHIO, Ana Terezinha. **Comparação fenotípica e genotípica entre cepas de *Salmonella enterica* subsp. enterica sorotipo 1,4,[5],12:i:- e de *Salmonella* Typhimurium**. 2006. 147 f. Tese. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. São Paulo, 2006.
- TOZETTO, Sílvia Morsolotto. **Sorotipos e tipagem molecular de isolados de *Salmonella enterica* no paraná no período de outubro de 2002 a maio de 2004**. 2006. 83f. Dissertação.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

TRABULSI, Luiz Rachid. et al. **Microbiologia**. Editora Atheneu, 4º Ed., 269-310, 2004.

VARGAS, D. S. T.; QUINTAES, K. D. Potencial perigo microbiológico resultante do uso de caixas plásticas tipo monobloco no armazenamento e transporte de pescados em São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, n.3, p. 517-522, 2003.

VERMELHO, A. B. et al. **Práticas de Microbiologia**. Editora Guanabara Koogan, 1ª Edição, São Paulo, 2006.

VIEIRA, M.A. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v.33, n.4. 2009.

VIEIRA, R.H.S.F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo, Livraria Varela, 2003.

XAVIER, A. Z. P; et al. **Condições higiênico-sanitárias das feiras-livres do município de Governador Valadares**. 2009. 95 f. Monografia (Curso de Nutrição). Faculdade de Ciências da Saúde. 2009.


WINN JÚNIOR, W.; et al. **Koneman Diagnóstico Microbiológico**. Texto e Atlas Colorido. Editora Guanabara Koogan. 6ª Edição. Rio de Janeiro, 2008. 1932 pág.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The 10 leading causes of death in the world, 2000 and 2012**. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>> Acesso em 27 nov 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Food safety and foodborne illness**. 2002. Disponível em: <<http://www.emro.who.int/emhj-volume-2-1996/volume-2-issue-1/article7.html>> Acesso em 25 fev 2019.

ANEXO 1

Lista de estabelecimentos que comercializam pescado fresco na cidade de Araguaína-TO cadastrados na vigilância sanitária



**PREFEITURA DE
ARAGUAÍNA**
A CAPITAL DO TOCANTINS

OFÍCIO/VISA/SMS Nº 56/2018

ESTADO DO TOCANTINS
PREFEITURA MUNICIPAL DE ARAGUAÍNA
SECRETARIA DA SAÚDE
VIGILÂNCIA SANITÁRIA

Araguaína-TO, 02 de abril de 2018.

À Sua Senhoria, as Senhoras
Bruna Alexandrino
Helen Mariel Biazussi
 Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Coletiva nos Trópicos - PPGSaspt
 Universidade Federal do Tocantins - UFT
 Nesta.

Assunto: Lista de estabelecimentos que comercializam pescado.


Prezadas Senhoras,

Com os cumprimentos de estilo, em resposta ao Ofício encaminhado a esta Coordenação de Vigilância Sanitária, informamos a relação de estabelecimentos cadastrados que comercializam pescados (fresco e congelados) no município de Araguaína (ANEXA). Ressaltamos que os estabelecimentos de maior porte comercializam durante todo o ano o pescado, enquanto os menores aproveitam apenas a época compreendida entre o início e o fim da Semana Santa.


Além de supermercados, há comércio exclusivo de peixes no município localizado no Mercado Municipal e nas feiras-livres do Centro (localizado à Rua 15 de Novembro no Centro, sábado de manhã), Entroncamento (localizado à Rua Fortaleza, Vila Rosário, domingo de manhã) e JK (localizado à Rua Castro Alves, JK, domingo de manhã).

Certos de termos atendido a demanda reitero protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,




Claudio Barbosa Aguiar
 Coordenador de Vigilância Sanitária
 Portaria 365/2017



**PRÊMIO MÉRITO
BRASIL**
GOVERNADOR GUSTAVO FERRELL
 SECRETÁRIO DE ESTADO

GOVERNADOR GUSTAVO FERRELL
 SECRETÁRIO DE ESTADO



**PRÊMIO EXCELÊNCIA
EM EDUCAÇÃO**
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO



ESTADO DO TOCANTINS
PREFEITURA MUNICIPAL DE ARAGUAINA
SECRETARIA DA SAÚDE
VIGILÂNCIA SANITÁRIA

Nome do Estabelecimento / Responsável	Responsável	Endereço		
SUPERMERCADO POMBO <i>10 vende</i>	Supermercado	BERNARDO SAYÃO	1026	BARROS
SUPERMERCADO SANTO ANTONIO <i>10</i>	Supermercado	AV. BERNARDO SAYÃO	1267	BARROS
SUPERMERCADO CAMPELO <i>A9</i>	Supermercado	MANGUEIRAS	1213	CENTRO
ATACADÃO BARATÃO <i>A8</i>	Supermercado	RUA ADEMAR VICENTE FERREIRA	705	CENTRO
SUPERMERCADO DO BAIANO	Supermercado	RUA 15 DE NOVEMBRO	412	CENTRO
A ECONOMICA <i>11 vende</i>	Supermercado	15 DE NOVEMBRO	372	CENTRO
SUPERMERCADO CAMPELO	Supermercado	RUA DAS MANGUEIRAS	1213	CENTRO
SUPER BOX ALVORADA	Supermercado	RUA FERRAZ DE CAMARGO	632	CEU AZUL
SUPERMERCADO SUPER SOUSA <i>A4</i>	Supermercado	RUA ONZE	105	COIMBRA
PATRÃO SUPERMERCADO	Supermercado	PALMAS	QD: 45 LT:20	COSTA ESMERALDA
COMERCIAL AÇOGUE STº ANTONIO	Supermercado	ADOLFO JUNIOR	QD:55 LT:37	COSTA ESMERALDA
SUPERMERCADO COSTA ESMERALDA	Supermercado	QUADRA 29	414	COSTA ESMERALDA
SUPERMERCADO CAMPELO	Supermercado	RUA 14	447	DOM ORIONE
SUPERMERCADO PREÇO BAIXO	Supermercado	GUATEMALA	323	ELDORADO
SUPERMERCADO ANDRADE <i>Imo A94</i>	Supermercado	JOSE DE BRITO SOARES	375	GEOGE YUNES
MERCADINHO OPÇÃO	Supermercado	RUA 12	1327	ITAPIJÁ
ATACADÃO BARATÃO PREMIER <i>A1</i>	Supermercado	AV. FILADELFIA	2.530	JARDIM BEIRA LAGO
CAMPELO ATACADÃO <i>A2</i>	Supermercado	AV. FILADELFIA	4.044	JD. FILADELFIA
SUPER BOX JK <i>A2</i>	Supermercado	AV. LONINA	905	JK
ARAUJO SUPERMERCADO	Supermercado	RUA ITAMATATY	391	MARACANÁ
SUPERMERCADO NUNES <i>10 vende</i>	Supermercado	RUA SANTA GALO	242	PANORAMA
O ATACADÃO	Supermercado	A. F. CAMARGO	140	RESIDENCIAL CAMARGO
SUPER FEIRÃO DA ECONOMIA <i>10 vende</i>	Supermercado	13 DE MAIO	996	RODOVIÁRIO
SUPERMERCADO BARATÃO <i>A3</i>	Supermercado	RUA TIRADENTES	789	SÃO JOÃO
ATACADÃO BARATÃO <i>A5</i>	Supermercado	AV. GUAÍBA	160	SÃO JOÃO
SUPERMERCADO TIRADENTES <i>A12</i>	Supermercado	RUA TIRADENTES	815	SÃO JOÃO



Rua 7 de Setembro, 315, Centro | 77.014-040 | +55 (68) 3412-9209
saude@araguaina.to.gov.br
www.araguaina.to.gov.br



ESTADO DO TOCANTINS
PREFEITURA MUNICIPAL DE ARAGUAINA
SECRETARIA DA SAÚDE
VIGILÂNCIA SANITÁRIA

SUPER SÃO MIGUEL <i>11 vende</i>	Supermercado	RUA SÃO JUDAS TADEU	655	SÃO MIGUEL
SUPERMERCADO OLIVEIRA <i>11 vende</i>	Supermercado	RUA SÃO JUDAS TADEU	821	SÃO MIGUEL
SUPERMERCADO CAMPELO <i>A12</i>	Supermercado	PREF. JOÃO DE SOUZA LIMA	780	SENADOR
HIPERNORTE SUPERMERCADO	Supermercado	RUA 18	QD 19 LT 08	VILA NORTE
COMERCIAL BELA VISTA	Supermercado	MATO GROSSO	718	VILA NOVA
MAIS PESCADO		DIVER/ VENDA DE PEIXES	RUA 54 QUAD. 84 LOT. 09	S/N ST. LIBERDADE
PEIXARIA MEDMAR	Peixaria	RUA 15 DE NOVEMBRO	S/N	MERCADO MUNICIPAL
PEIXARIA SÃO JOSÉ	Peixaria	RUA 15 DE NOVEMBRO	S/N	MERCADO MUNICIPAL
PEIXARIA PEIXE VIVO	Peixaria	RUA 15 DE NOVEMBRO	S/N	MERCADO MUNICIPAL
PEIXARIA SÃO SEBASTIÃO <i>A5</i>	Peixaria	RUA 15 DE NOVEMBRO	S/N	MERCADO MUNICIPAL
PEIXARIA JHULLY <i>A6</i>	Peixaria	RUA 15 DE NOVEMBRO	S/N	MERCADO MUNICIPAL
DENIA AQUINO DE SOUSA	Venda ambulante pescado	PAU BRASIL	QD 13 LT 03	ARAGUAINA SUL
EDIMAR CORREIA FREIRE	Venda ambulante pescado	RUA ANA MARIA,	2	ANA MARIA
JOSE MARIA RODRIGUES DOS SANTOS	Venda ambulante pescado	RUA 19	N245	NOVA ARAGUAINA
ALDEMAR DIAS DA SILVA	Venda ambulante pescado	RUA DAS CANELAS	115	VILA RIBEIRO
EDIVÁ CRISPIM DOS SANTOS	Venda ambulante pescado	RUA PAU BRASIL	N742	ARAGUAINA SUL
FRANCISCO DE ASSIS SOUSA FILHO	Venda ambulante pescado	RUA ALFREDO NASSAR	801	SÃO JOÃO
GILDEVALDO CRISPIM DE SOUSA	Venda ambulante pescado	RUA MACHADO DE ASSIS	779	SÃO JOÃO
LUIZ CARLOS NOGUEIRA BASTOS	Venda ambulante pescado	RUA ALFREDO NASSER	1099	IMACULADA CONCEIÇÃO
ONITO AMARAL BARBOSA	Venda ambulante pescado	RUA PITAGORAS	QD. 32 LT. 23	UNIVERSITÁRIO
JOLIVETH BARBOSA DOS REIS	Venda ambulante pescado	RUA ALFREDO NASSER	1063 CASA 02	SÃO JOAO
LUCAS SOUSA SILVA	Venda ambulante pescado	RUA MACHADO DE ASSIS	779	SÃO JOÃO
JOSE EGIDIO DE OLIVEIRA	Venda ambulante pescado	RUA RECIFE	180	BRASIL
MARCONDES FERREIRA DE MESQUITA	Venda ambulante pescado	MURICY I		IMACULADA CONCEIÇÃO
SALVIANO CRISPIM DOS SANTOS	Venda ambulante pescado	RUA PARAGUAI	294	LAGO AZUL III
DNILTON RODRIGUES DOS SANTOS	Venda ambulante pescado	PAU BRASIL	QD 13 LT 03	ARAGUAINA SUL
GIUBERTO SOUZA BARBOZA	Venda ambulante pescado	RUA DAS CAVIUNAS, S/N	QD F-07, LT:09	ARAGUAINA SUL



Rua 7 de Setembro, 315, Centro | 77.014-040 | +55 (68) 3412-9209
saude@araguaina.to.gov.br
www.araguaina.to.gov.br



ANEXO 2

Tabela completa dos resultados das análises microbiológicas de pescados frescos comercializados na cidade de Araguaína/TO

Amostra	Coliformes a 45°C NMP/mL	Psicrotróficos UFC/mL	Quantidade de Colônias		Tipo de estabelecimento
			<i>Salmonella</i> ssp.	<i>E. coli</i>	
1	<0,3	Incontáveis	0	2	Supermercado
2	<0,3	Incontáveis	5	2	Supermercado
3	<0,3	4,4x10 ⁶ (log 6,64)	0	0	Supermercado
4	<0,3	Incontáveis	0	0	Peixaria
5	<0,3	Incontáveis	0	1	Peixaria
6	<0,3	Incontáveis	2	0	Peixaria
7	0,6	Incontáveis	0	0	Supermercado
8	0,3	1,69x10 ⁸ (log 8,22)	0	0	Supermercado
9	0,36	Incontáveis	3	0	Supermercado
10	1,6	Incontáveis	0	0	Supermercado
11	0,91	Incontáveis	0	0	Supermercado
12	1,4	Incontáveis	0	0	Supermercado
13	0,73	Incontáveis	0	0	Supermercado
14	9,3	< 25 colônias	1	0	Supermercado
15	11	< 25 colônias	0	0	Supermercado
16	0,72	Incontáveis	9	0	Supermercado
17	24	Incontáveis	1	0	Supermercado
18	0,62	Incontáveis	0	0	Supermercado
19	24	6x10 ⁶ (log 6,77)	0	0	Supermercado
20	4,3	< 25 colônias	4	0	Peixaria
21	46	Incontáveis	0	0	Feira livre
22	>110	Incontáveis	1	0	Feira livre
23	12	Incontáveis	0	0	Feira livre
24	24	< 25 colônias	0	0	Feira livre
25	2,1	1,4x10 ⁹ (log 9,14)	0	0	Feira livre
26	1,5	< 25 colônias	0	0	Feira livre
27	<0,3	< 25 colônias	0	0	Feira livre
28	<0,3	< 25 colônias	0	0	Feira livre
29	1,2	2,6x10 ⁷ (log 7,41)	0	0	Feira livre
30	>110	4,6x10 ⁸ (log 8,66)	0	0	Feira livre
31	15	< 25 colônias	0	0	Feira livre
32	0,91	Incontáveis	0	0	Feira livre
33	0,3	5,7x10 ⁶ (log 6,75)	0	0	Feira livre