



**UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES NA
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE PESCADOS
COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE CUIABÁ-MT.**

DÉBORA CRISTINA PASTRO

CUIABÁ – MT
MARÇO DE 2016

DÉBORA CRISTINA PASTRO

Orientadora: Profa. Dra. Gilma Silva Chitarra

Coorientadora: Profa. Dra. Sandra Mariotto

**UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE
PESCADOS COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE CUIABÁ-MT.**

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos e linha de pesquisa em Qualidade de Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

CUIABÁ – MT

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Divisão de Serviços Técnicos. Catalogação da Publicação na Fonte. IFMT Campus
Cuiabá Bela Vista

Biblioteca Francisco de Aquino Bezerra

P291u

Pastro, Débora Cristina.

Utilização de técnicas moleculares na qualidade microbiológica de pescados comercializados no município de Cuiabá-MT/ Débora Cristina Pasto. _ Cuiabá, 2016.

63f.

Orientador(a): Prof. Dra. Gilma Silva Chitarra

Co-orientador(a): Prof. Dra. Sandra Mariotto

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) _.
Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Mato Grosso.

1. Bactérias – Dissertação. 2. DNA – Dissertação. 3. Microbiologia -
Dissertação. I. Chitarra, Gilma Silva. II. Mariotto, Sandra. III. Título.

IFMT CAMPUS CUIABÁ BELA VISTA

CDU 579

CDD 576.163

DÉBORA CRISTINA PASTRO

**UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE
PESCADOS COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE CUIABÁ-MT.**

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos e linha de pesquisa em Qualidade de Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

DATA DE DEFESA PÚBLICA: 29/03/2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Gilma Silva Chitarra

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso

Profa. Dra. Sandra Mariotto

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso

Profª. Dr. João Vicente Neto

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso

Profa. Dra. Selma Baia Batista

Centro Universitário de Várzea Grande – UNIVAG

ATESTADO

Atesto terem sido feitas as correções sugeridas pela Comissão Examinadora.

Orientadora: Profa. Dra. Gilma Silva Chitarra
Presidente da Comissão Examinadora

CUIABÁ – MT

2016

Dedico este trabalho...

*A Deus por ser meu refúgio e minha fortaleza;
Aos meus pais, Zeni e Vilson, por serem meu exemplo de vida,
força, dedicação, honestidade e amor;
A minha irmã Cristiane e minha sobrinha Clara por tornarem meus
dias mais felizes;
Ao meu namorado e eterno amigo Nathan por todo apoio, amor e
cumplicidade.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, Início, Meio e Fim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Mato Grosso (IFMT), pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa.

A Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) pelo acesso e estrutura física que possibilitaram a realização deste trabalho.

A minha orientadora Ph. D. Gilma Silva Chitarra e minha coorientadora Dr^a Sandra Mariotto por todos os ensinamentos ao longo dessa caminhada, pela dedicação, paciência e principalmente pela amizade que construímos. Obrigada pela confiança que depositaram em mim, obrigada por todas as oportunidades que me proporcionaram, obrigada por transmitirem os conhecimentos fundamentais para a realização deste trabalho. Mais que a minha gratidão, vocês possuem a minha admiração.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Mato Grosso que contribuíram nesta caminhada e na realização deste sonho.

Aos meus pais, Zeni e Vilson que não mediram esforços e dedicação para me apoiarem, que entre escolhas na maioria das vezes optaram por mim. Ao longo da minha vida sempre estavam comigo, me incentivando e me ensinando os verdadeiros valores da vida, com muito amor. Pai e Mãe, meu eterno OBRIGADA! Obrigada por jamais deixarem de acreditar em mim.

A minha irmã Cristiane, minha sobrinha e afilhada Clara e meu cunhado Ricardo, que mesmo distantes estavam presentes em minha mente e coração, Clarinha é nosso maior tesouro.

Ao meu namorado e eterno amigo Nathan, por todo amor, cumplicidade, paciência e dedicação. Você me ensina a cada dia ser uma pessoa melhor.

As minhas amigas Amanda, Alessandra, Flavia, Karen e Dayane, por todo o apoio no decorrer desses dois anos de mestrado e por tudo o que representam em minha vida. Vocês são muito especiais e fazem parte dessa vitória.

A Erika e Jakeline, companheiras de trabalho, agradeço por toda a caminhada.

Aos professores parceiros do laboratório de genética animal da UFMT, Daniela Cristina Ferreira, Paulo Cesar Vênere, Liano Centofante; e aos colegas de rotina na pesquisa: Gisele, Thais, Renata, Ricardo, Elisângela, Duda, Thiago e Victor. Obrigada pela amizade e ajuda no decorrer deste trabalho.

Ao laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso pelo auxílio no decorrer do trabalho.

Aos alunos do mestrado Elaine, Keyla, Samira, Aline, Patricia, Marcel, Leandro e João Maia. Obrigada por todas as experiências vividas nesse período.

A FAPEMAT e o MEC/SETEC/CNPQ pelo auxílio financeiro.

E, finalmente, a todos que direta ou indiretamente colaboraram durante todo o processo de realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Pastro, Débora Cristina. Utilização de técnicas moleculares na qualidade microbiológica de pescados comercializados no município de Cuiabá-MT. Dissertação (Mestrado). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso – Campus Cuiabá Bela Vista, 2016. 63p.

O pescado é um alimento saudável, porém altamente suscetível a deterioração, devido a sua composição química e o pH próximo a neutralidade, favorecendo o desenvolvimento de bactérias. O Estado de Mato Grosso tem se destacado economicamente no âmbito nacional pela melhoria na produção aquícola, além de apresentar elevado índice de consumo de pescados pela população. Objetivou-se com este estudo analisar a presença de bactérias patogênicas e a diversidade bacteriana em espécies de peixes comercializados no Município de Cuiabá-MT, Brasil, utilizando ferramentas de genética molecular. Foram detectados 11 gêneros bacterianos através do sequenciamento do gene 16S: *Enterobacter* (29,29%), *Aeromonas* (24,24%), *Pseudomonas* (17,17%), *Enterococcus* (10,10%), *Acinetobacter* (6,06%), *Citrobacter* (4,04%), *Bacillus* (3,03%), *Klebsiella* sp. e *Lactococcus* (2,02%) e, por fim, *Clostridium* e *Lysinibacillus* (1,01%), apresentando percentuais elevados de bactérias que diminuem a qualidade do pescado. Com a utilização de *primers* espécie específicos foram detectadas a presença das espécies de *Escherichia coli* (35,71%), *Staphylococcus aureus* (12,5%) e do gênero *Salmonella* sp. (7,14%) e ausência de *Shigella* sp. A qualidade microbiológica dos pescados comercializados no estado de Mato Grosso não estão em conformidade ao que prescrevem a legislação. As técnicas moleculares utilizadas para detecção e identificação de bactérias, constituem uma alternativa rápida e confiável, podendo ser utilizada em larga escala.

Palavras – Chave: Bactérias, DNA, Microbiologia.

ABSTRACT

Pastro, Débora Cristina. Use of molecular techniques in the microbiological quality of fish marketed in the city of Cuiabá-MT. Dissertation (Master's). Federal Institute of Education, Science and Technology Mato Grosso - Cuiabá Campus Bela Vista, 2016. 63p.

Fish is a healthy food, but highly susceptible to deterioration due to their chemical composition and pH close to neutrality, favoring the development of bacteria. The state of Mato Grosso has been economically deployed nationwide by improving aquaculture production, in addition to presenting high fish consumption rate by the population. The objective of this study is to analyze the presence of pathogenic bacteria and bacterial diversity in fish species marketed in the city of Cuiabá-MT, Brazil, using molecular genetic tools. They were detected 11 bacterial genera by sequencing the 16S: *Enterobacter* (29.29%), *Aeromonas* (24.24%), *Pseudomonas* (17.17%), *Enterococcus* (10.10%), *Acinetobacter* (6.06%), *Citrobacter* (4.04%), *Bacillus* (3.03%), *Klebsiella* sp. and *Lactococcus* (2.02%) and finally, *Clostridium* and *Lysinibacillus* (1.01%), with high percentages of bacteria which reduce the quality of the fish. With the use of primers specific species were detected the presence of the species *Escherichia coli* (35.71%), *Staphylococcus aureus* (12.5%) and the genus *Salmonella* sp. (7.14%), and absence of *Shigella* sp. therefore, the microbiological quality of fish marketed in the state of Mato Grosso do not conform to what prescribe the legislation. The molecular techniques for detection and identification of bacteria constitute a quick and reliable alternative, which may be used on a large scale.

Keywords: Bacterias, DNA, Microbiology.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 1,5%37
- Figura 2. Bactérias detectadas pelo gene 16S rDNA em em tecidos musculares de peixes de ocorrência natural e de cativeiro. Cuiaba–MT, 2016.....37
- Figura 3. Bactérias detectadas pelo gene 16S rDNA em tecidos musculares de peixes de ocorrência natural e de cativeiro, e respectiva percentagem de contaminação das 66 amostras analisadas. Cuiabá – MT, 2016.....42

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Gêneros bacterianos e seus respectivos números de acesso.....	48
Tabela 2. Desenho dos <i>primers</i> espécie específico de acordo com os respectivos autores.....	48

LISTA DE ABREVIações

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
APHA	American Public Health Association
ATP	Trifosfato de Adenosina
BHI	Caldo brain heart infusion
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTAs	Doenças Transmitidas por Alimentos
FAO	Food and Agriculture Organization
FAPEMAT	Fundação de Ampara a Pesquisa de Mato Grosso
IFMT	Instituto Federal de Educação de Mato Grosso
IFMT	Instituto Federal de Educação de Mato Grosso
MPA	Ministério da Pesca e Agricultura
PB	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIB	Produto Interno Bruto
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
UFMT	Universidade Federal de Mato Grosso
V	Volts

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Introdução	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. Produção Aquícola.....	16
2.2. Pescado.....	17
2.3. Contaminação microbiológica e deterioração do pescado	18
2.3.1. <i>Escherichia coli</i>	22
2.3.2. <i>Salmonella</i> sp.	23
2.3.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	24
2.3.4. <i>Shigella</i> sp.	25
2.4. Detecção molecular por PCR.....	26
3. REFERÊNCIAS	29

CAPÍTULO 2: UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE PESCADOS COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE CUIABÁ-MT.

Introdução	36
Material e Métodos	37
Delineamento experimental	37
Coleta das amostras experimento 1.....	38
Cultivo das bactérias experimento 1	38
Extração de DNA experimento 1.....	39
Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) experimento 1.....	39
Análise de sequência de nucleotídeos experimento 1	40
Coleta das amostras experimento 2.....	40
Extração de DNA experimento 2.....	41
Reação em cadeia pela polimerase (PCR) experimento 2.....	41
Resultados e Discussão	42
Gene 16S rDNA.....	42
<i>Primers</i> espécie específico	46
Conclusão	49
Agradecimentos	49

Referências	50
ANEXOS	54

CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

A indústria pesqueira no Brasil é um dos setores de maior crescimento e lucratividade. Produz aproximadamente 2 milhões de toneladas de pescado, sendo que 40% são cultivados. A atividade gera um PIB de R\$ 5 bilhões, mobiliza 800 mil profissionais, entre pescadores e aquicultores, e proporciona 3,5 milhões de empregos diretos e indiretos (HILSDORF & PETRERE, 2002; BRASIL, 2014).

O Estado de Mato Grosso produziu em 2011, aproximadamente, 49 mil toneladas de peixes cultivados em água doce, sendo o terceiro maior produtor nacional e o maior produtor na região Centro Oeste. Além disso, tem se destacado economicamente no âmbito nacional pela melhoria na produção aquícola, além de apresentar alto índice de consumo (BRASIL, 2014).

O crescimento do consumo de peixes no Estado se deve a preferência por alimentos de alto valor nutricional, incremento do turismo e também a forte influência da cultura regional. Deste modo, o peixe assume destaque pelo seu alto valor proteico, rápida digestibilidade, baixo teor de gordura e presença de ácidos graxos poli-insaturados, sugerindo tendências de aumento do consumo (FAO,2006).

O pescado fresco é um produto altamente perecível, por isso sua qualidade deve ser preservada para evitar uma elevada carga microbiana, que pode ser composta por microrganismos tanto deteriorantes quanto patogênicos, causando, dessa forma, perdas na qualidade e danos a saúde do consumidor (COSTA et al, 2012). Após ser capturado deteriora gradualmente, pois é um alimento altamente perecível, devido a fatores como pH próximo da neutralidade, elevada atividade de água, alto teor de nutrientes, atividade metabólica, e também pelas constantes agressões aos ambientes aquáticos e prática inadequada de manuseio (SILVA et al. 2002).

Os problemas de saúde ocasionados pelo consumo de pescado deteriorado se devem, principalmente, a prática deficiente na produção, manipulação, transporte e armazenamento em temperaturas inadequadas. Por essa razão a segurança alimentar deve ganhar espaço e atenção no mundo, devido à ocorrência de doenças transmitidas pelos alimentos (WHO,2015).

O pescado quando contaminado por bactérias patogênicas pode resultar em doenças de origem alimentar, causando danos a saúde do ser humano e a melhor forma de prevenção das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), está no controle das

bactérias em pescado, e com isso a detecção dessas bactérias é de fundamental importância. Os métodos tradicionais de isolamento e identificação de bactérias são baseados principalmente no cultivo e análise morfológico, fisiológico e bioquímico dos microrganismos. Esses métodos demandam muito tempo e extenso trabalho. Entretanto, alguns microrganismos não são cultiváveis por técnicas padrões, pelas condições físicas ou químicas de crescimento ou até mesmo pela interdependência intrínseca de outros microrganismos (SILVA et al. 2002; ALMEIDA, 2009).

Um importante avanço na detecção de patógenos alimentar é o uso de técnicas moleculares para detecção de DNA bacteriano, pode ser utilizada para identificar e quantificar microrganismos, independentemente de cultivos puros para análise da comunidade bacteriana (MALORNY et al., 2003).

Com a demanda e exigência de qualidades fitossanitárias dos alimentos, se faz urgente o uso de tecnologias moleculares na identificação de microrganismos; por ser considerado método rápido, confiável e podendo ser utilizado em larga escala. Diante desta perspectiva, objetivou-se no presente estudo analisar a presença e a diversidade de bactérias patogênicas em espécies de peixes comercializados no Município de Cuiaba-MT, utilizando técnicas moleculares.

O Capítulo 2 deste trabalho, denominado “Utilização de técnicas moleculares na qualidade microbiológica de pescados comercializados no município de Cuiabá-MT. apresenta-se de acordo com as normas para submissão da revista Pesquisa Agropecuária Brasileira.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção Aquícola

O Brasil possui enorme potencial para a produção de pescado, com 12% da água doce disponível do planeta, condições ambientais e climáticas favoráveis e tanta riqueza natural tem potencial para se tornar um dos maiores produtores de pescado no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o pescado é a proteína animal mais saudável e consumida no mundo. Os brasileiros ultrapassaram o consumo mínimo de pescado recomendado pela OMS que é de 12 quilos por habitante ao ano. No Brasil, o consumo chega a 14,50 quilos por habitante/ano (BRASIL, 2013).

Mato Grosso se destaca em âmbito nacional por possuir três diferentes bacias hidrográficas: Bacia do Paraguai, Bacia Amazônica e Bacia Araguaia-Tocantins. Além da

diversidade de sistemas aquáticos a existência de vegetação de três ecossistemas: Amazônia, Cerrado e Pantanal que favorecem a diversidade ictiofaunística nestes sistemas aquáticos (MMA,2007). Segundo o IBGE (2013), o estado produziu 105 mil toneladas de peixes cultivados em água doce, sendo o terceiro maior produtor nacional e o maior produtor na região Centro Oeste. Sorriso, município há 400 km de Cuiabá, se destaca no estado, com uma produção de 21,5 mil toneladas e Cuiabá com uma produção de 4.235 toneladas. O estado apresenta grande potencial de crescimento pela alta disponibilidade de produtos para a indústria de ração, abundância de água doce, clima favorável e alta demanda do consumo tanto interno como externo.

Atualmente, dentre os grupos de peixes mais cultivados no Mato Grosso, destacam-se os peixes redondos com escamas (formados pelas espécies de ambiente natural pacu, tambaqui e seus híbridos, tambacu e tambatinga), peixes de couro (pintado e caxara) e os brycons, também de escamas (piraputanga e matrinxã).

2.2. Pescado

Pescado é considerado todo e qualquer animal aquático oriundo de água doce ou salgada, obtidos por diferentes processos de captura, ou pesca destinados a servirem de alimento (FERREIRA, 2002). Podem ser de ambientes naturais ou de cativeiros, tendo em vista a facilidade de cultivo de uma ampla variedade de espécies.

O pescado possui características de alimento benéfico à saúde do consumidor, devido a sua alta qualidade como teor de proteínas de fácil digestibilidade, ricos em aminoácidos essenciais e micronutrientes, fonte de vitaminas A, B1, B2 e D, ferro, fósforo e cálcio. O pescado possui elevado índice de ácidos graxos, necessários ao desenvolvimento do cérebro e do corpo, é rico em ácidos graxos poliinsaturados, especialmente o ômega-3 (SANTOS, 2006). É considerado um dos alimentos mais completos para o consumo humano pelo seu valor nutritivo e por apresentar gorduras não saturadas que auxiliam na redução do colesterol (CENTEC, 2004).

Em contraste com sua importância nutricional, o pescado é um dos alimentos mais suscetíveis à deterioração, devido à alta atividade de água, composição química que varia em função da espécie, época do ano e condições de alimentação, presença de gorduras insaturadas facilmente oxidáveis e, principalmente, ao pH próximo da neutralidade, o que favorece o desenvolvimento microbiano (LANDGRAF, 1996). Está sujeito à contaminação

por vários microrganismos, que ocorrem desde o ambiente aquático ou durante as etapas de captura, transporte e distribuição (VALLANDRO et al., 2010).

O pescado pode ser comercializado na forma *in natura* ou industrializado. O processo de industrialização compreende na manipulação e preservação deste produto, tais como salga, defumação, embutidos, entre outros, é recomendado que o mesmo seja submetido a essas etapas pois agregam valor comercial, aumentando a vida de prateleira (GOMIDE, 2006).

Para que o processamento do pescado seja empregado corretamente para cada espécie, é necessário que haja conhecimento sobre as características físicas e químicas do mesmo. O pescado pode ser adquirido em diversificados comércios, especializados ou não, como peixarias, sacolões, supermercados e feiras livres. Em geral, pode ser vendido inteiro ou na forma de filé e pode estar *in natura*, refrigerado ou congelado (MURATORI et al., 2004, GOMIDE, 2006).

2.3. Contaminação microbiológica e deterioração do pescado

Segundo Landgraf (1996) e Teixeira (2009), dentre os produtos de origem animal, o pescado é o mais sujeito à deterioração, devido ao pH, atividade de água nos tecidos, riqueza em nutrientes, quantidade de proteína, presença de lipídios insaturados, alto teor de umidade, rápida ação das enzimas autolíticas e alta atividade metabólica da microbiota. Essas características o faz uma excelente fonte para o desenvolvimento microbiano e facilita a atuação dos microrganismos no tecido animal.

Quanto aos microrganismos, os mais importantes na deterioração do pescado são as bactérias. Estas estão largamente distribuídas nos peixes de água doce ou salgada, encontram-se presentes principalmente nos intestinos, nas guelras e no limo da superfície da pele do animal, mesmo no pescado ainda vivo, mas não penetram na carne devido suas defesas naturais. O ataque de bactérias ocorre com a morte do animal e aumentam a velocidade de multiplicação quando termina o *rigor mortis*. Algumas espécies de bactérias morrem após o consumo do primeiro constituinte, as substâncias nitrogenadas não-proteicas. Outras, porém, sobrevivem e se reproduzem após este período inicial, utilizando as proteínas do pescado, resultando na formação de substâncias com odor desagradável. A continuidade da ação dessas bactérias intensifica o odor e torna o pescado impróprio para o consumo (NUNES; BATISTA; CARDOSO, 2006).

Alguns microrganismos que podem contaminar o pescado são patogênicos, enquanto outros não causam enfermidades aos seres humanos, mas são indicadores de condições higiênicas inadequadas, sendo que a sua presença pode indicar a existência de microrganismos patogênicos. Entre os microrganismos indicadores de qualidade higiênica estão os coliformes totais e coliformes termotolerantes. Apesar de alguns trabalhos relatarem a presença de coliformes no trato intestinal de peixes, estes não são considerados habitantes naturais da sua microbiota intestinal, permitindo, assim, correlação com as condições microbiológicas da água onde o peixe se encontra (JAMI et al., 2014).

Entre os gêneros que fazem parte da microbiota natural do pescado podem ser citados *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Vibrio* e *Micrococcus*. Os mais importantes deteriorantes são os gêneros *Pseudomonas* e *Shewanella*, principais responsáveis pelas alterações organolépticas do pescado devido à formação de trimetilamina, ésteres, substâncias voláteis redutoras e outros compostos (LANDGRAF, 1996).

Segundo Tavares et al. (1988) e Guzmán (2004), a carne do pescado difere grandemente das demais carnes quanto à sua captura, abate, estocagem e processamento, acarretando em problemas de distribuição e perecibilidade. As fontes de contaminação dependem do tipo de pescado e da manipulação deste durante e após a pesca. Os principais agentes de deterioração podem estar relacionados aos quesitos básicos de higiene, *rigor mortis*, microrganismos e autólise.

O *rigor mortis*, está associado aos estágios iniciais de deterioração do pescado, sendo considerada uma contração muscular irreversível devido à grande formação de actomiosina, e a ausência de energia (ATP) suficiente para quebrar esta ligação, que no caso do pescado, este tipo de energia se esgota rapidamente devido a movimentação excessiva dos peixes por ocasião da captura. Por esse motivo, a fase de *rigor mortis* em pescado inicia-se rapidamente e tem curta duração. Sabe-se que as alterações bacteriológicas só iniciam após esta fase, e como a mesma é de curta duração em peixes, a vida comercial do pescado, é menor que a dos outros animais (FERREIRA et al., 2002; NUNES; BATISTA; CARDOSO, 2006).

Ainda, segundo Cardoso (2006), a autólise é provocada pela ação de enzimas nos constituintes do pescado após a sua morte, se fazem presentes tanto nas vísceras como na carne. Sua ação também resulta na produção de substâncias com odor desagradável, bem como produzem outras substâncias que servem de alimento as bactérias e o

amolecimento da carne do pescado. Como consequência das alterações microbianas, físicas e químicas da carne do pescado, este se torna impróprio para o consumo, pois apresentará características indesejáveis, tais como o amolecimento da carne e características sensoriais alteradas e será um potencial risco a saúde do consumidor.

Segundo Ferreira et al. (2002), outro fator que pode acelerar a deterioração do pescado são os lipídios, que, na maioria, são formados por ácidos graxos poli-insaturados que quando interagem com o oxigênio atmosférico resultam na oxidação deste lipídio, o que ocasiona a rancificação da carne do pescado.

As modificações ou alterações do pescado para a imediata utilização para o consumo é lenta e gradual e de difícil identificação. Desde muito se tem buscado um sistema prático de determinar a qualidade do pescado. São muitas as maneiras de se identificar um pescado deteriorado, porém alguns cuidados devem ser tomados para a correta verificação dos sinais (CARVALHO, 2010).

Assim, um dos fatores mais importantes para detecção do início da deterioração do pescado é a presença de diversos microrganismos presentes na água, bem como em sua microbiota natural, e a velocidade de decomposição está condicionada aos fatores endógenos e exógenos. Os fatores endógenos são a composição química e a textura dos tecidos e os fatores exógenos, a temperatura, microrganismos presentes, processamento e manipulação (FELDHUSEN, 2000; BARROS, 2003),

O crescimento bacteriano no pescado após a sua captura e ao longo do armazenamento sob refrigeração é, seguramente, o principal responsável pela deterioração. A penetração microbiana nos músculos a partir das vísceras ou guelras ocorre com intensidades diferentes, dependendo fundamentalmente das condições de temperatura e umidade durante o armazenamento; ou seja, quanto mais elevada a temperatura e a umidade, mais rápida será a penetração e deterioração. No entanto, nas condições usuais de armazenamento, sob refrigeração, as alterações sensoriais e químicas que levam à rejeição do produto são fundamentalmente restritas ao ataque às substâncias nitrogenadas não-proteicas presentes no tegumento e no muco superficial. Em pescados quando são mantidos a temperaturas mais elevadas a penetração bacteriana será intensa e o tecido muscular será atacado pelos microrganismos (CARVALHO, 2010; JAY, 2005).

A falta de boas práticas de pescadores e empresários na cadeia produtiva do pescado, é fator determinante para o aumento da contaminação. Desde o momento em que o pescado é retirado da água ele começa a sofrer processos de deterioração, que podem

ser acelerados ou retardados pelos manipuladores. A contaminação do pescado contribui para a redução da qualidade do produto, que chega ao consumidor com uma carga microbiana acima do permitido por legislação (ALMEIDA et al., 2002).

Segundo Centec (2004), higiene é a aplicação de conhecimentos e preceitos que se destinam a cuidar do processamento do pescado a fim de preservar a saúde dos consumidores, e para que isto ocorra, três fatores são fundamentais: a higiene corporal do manipulador, do local de trabalho e dos utensílios utilizados. Por isso, de acordo com Jesus et al (2002), as tecnologias utilizadas para o processamento do pescado, tem por objetivo seu melhor aproveitamento.

Devido ao contato dos peixes com a água, a microbiota presente em sua superfície corporal, brânquias e no trato gastrintestinal, está relacionada qualitativa e quantitativamente com aspectos microbiológicos do ambiente. Assim, peixes capturados em ambientes poluídos por esgotos, dejetos e fezes, podem abrigar microrganismos patogênicos e indicadores de poluição fecal (GUZMÁN, et al., 2004).

Algumas bactérias estão presentes naturalmente na água, a exemplos espécies patogênicas de *Vibrio* e *Aeromonas* e no meio ambiente espécies de *Listeria monocytogenes* e *Clostridium botulinum*. Estes patógenos podem, portanto, também ser encontrados em peixes vivos. A contaminação pré-captura com patógenos de reservatórios animal/humano, espécies de *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* e vírus entéricos, pode oferecer risco, pois em alguns casos uma dose infectante baixa é suficiente para provocar uma doença (HUSS et al., 2000; BASTI et al. 2006).

As contaminações ocorrem na pré ou pós captura dos peixes, salientando que uma pequena população é suficiente para provocar doenças. Para as bactérias indicadores de contaminação ambiental e fecal, são realizadas contagens de *Staphylococcus* sp., *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*, sendo indicativo da qualidade do produto (LIMA; REIS, 2002; BARRETO, 2012).

No Brasil, a Resolução RDC nº 012, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, define critérios microbiológicos para alimentos expostos à venda e à exportação (BRASIL, 2001). Entre os parâmetros a serem observados no pescado à venda, estão: *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* sp. Entretanto, para o pescado comercializado *in natura*, resfriados ou congelados não é necessária a determinação de microrganismos indicadores de higiene como os coliformes

termotolerantes ou *Escherichia coli*, salientando a ausência de *Salmonella* sp. (BRASIL, 2001).

Segundo Peixoto e Toledo (1998) apud Barbosa (2013), para evitar o aumento da população de microrganismos, principalmente, dos responsáveis pela decomposição excessivamente rápida, existem três formas importantes de prevenção cuidado, limpeza e refrigeração. O cuidado durante a manipulação é essencial, visto que os danos podem facilitar, através de cortes e feridas, o acesso de bactérias deteriorantes, acelerando, deste modo, seu efeito sobre a carne. A limpeza é importante sob dois pontos de vista: as fontes naturais de bactérias podem ser eliminadas; e a probabilidade de contaminação pode ser reduzida ao mínimo, assegurando que o pescado seja sempre manipulado de forma higiênica. Porém, o mais importante é resfriar o pescado o mais rápido possível e mantê-lo refrigerado. Quanto maior a contaminação, menor o tempo de conservação, a uma dada temperatura.

O número de casos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) causados por pescados é geralmente baixo quando comparado aos causados por aves, laticínios e outras carnes. Entretanto, a importância do pescado como veiculador de patógenos depende de fatores como a dieta e forma de preparo. Assim, no Japão, onde o peixe é importante parte da dieta, sendo muitas vezes consumido cru, a proporção de DTAs oriunda de pescados é maior (HUSS et al., 2000).

Conforme Novotny et al. (2004), os surtos de bactérias, consideradas potencialmente patogênicas, geralmente ocorrem devido a ingestão de peixes tratados termicamente de forma insuficiente após a sua manipulação e/ ou processamento. Estas incluem: *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp., *Shigella* sp., entre outras.

2.3.1. *Escherichia coli*

Bactéria anaeróbia facultativa que faz parte da flora intestinal de animais de sangue quente, bacilo gram-negativo, não esporulado, capaz de fermentar a glicose com a produção de ácido e gás, pertencente à família Enterobacteriaceae. A presença de *E. coli* em alimentos pode ter dois significados. Por ser uma enterobactéria, uma vez no alimento indica contaminação de origem fecal, apontando condições higiênicas insatisfatórias. Por outro lado, diversas linhagens de *E. coli* são patogênicas para o homem, e não devem estar presentes em alimentos, como exemplo podemos citar a EPEC (*E. Coli* enteropatogênica),

ETEC (*E.Coli* enterotoxigênica), EIEC (*E.Coli* enteroinvasiva). Em alimentos industrializados a presença de qualquer microrganismo do grupo coliformes indica processamento inadequado e/ou recontaminação pós-processamento. Contaminações podem ser oriundas de matéria prima, equipamentos sujos ou manipulação sem cuidados de higiene. Na proliferação microbiana podem ocorrer a multiplicação de microrganismos patogênicos (FRANCO & LANDGRAF 2008).

Dentre os coliformes termotolerantes mais importantes para avaliar a presença de patógenos em ambientes aquícolas pode-se mencionar a espécie *Escherichia coli*, que por não fazer parte da microbiota normal do pescado, pode estar associada: à contaminação fecal do local onde o pescado foi capturado; ao transporte e manuseio, incluindo vasilhame e gelo utilizados; e aos outros processos e materiais que possam ter entrado em contato com o pescado fresco. Portanto, sua presença indica condições sanitárias insatisfatórias (AGNESE et al.,2001)

Outro fator que pode favorecer a ocorrência de estirpes de *Escherichia coli* patogênicas no ambiente aquícola ou no pescado comercializado é a utilização inadequada de antimicrobianos, pois estas podem adquirir genes de resistência e aumentar a possibilidade de infecção aos consumidores do produto final. A presença de *Escherichia coli* multirresistente tem sido relatada tanto em ambientes aquáticos como em fontes animais (RAHMAN, 2011).

Barbosa (2013), em seu estudo afirmou que de forma geral, a ocorrência de *Escherichia coli* patogênica em ambientes aquícolas e produtos da pesca ainda possui pouca atenção. Porém, conhecer e controlar esse patógeno neste ambiente pode ser uma forma fácil para o controle de contaminantes e garantia da qualidade do produto final.

2.3.2. *Salmonella* sp.

O gênero *Salmonella* é constituído por bactérias Gram-negativas em forma de bastonete pertencentes à família Enterobacteriaceae, aeróbios, em sua maioria móveis com flagelos peritríquios, não esporulados e não capsulados. O pH ótimo para a multiplicação é próximo de 7,0 e a temperatura ideal encontra-se na faixa de 35 a 37°C (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

É uma bactéria entérica responsável por graves intoxicações alimentares, sendo um dos principais agentes envolvidos em surtos registrados em vários países. O conhecimento

da distribuição de *Salmonella* sp., no meio ambiente e nos alimentos, tem despertado o interesse dos microbiologistas, por permitir entender a origem e a magnitude dos riscos, associados com o consumo de alimentos expostos à contaminação. Este conhecimento leva a ações preventivas e corretivas, tanto por parte de agências governamentais, como da indústria de alimentos (ESCArtÍN & VITELA, 1996; MAIJALA & RANTA, 2005).

A *Salmonella* é considerada o principal agente bacteriano causador das Doenças Transmitidas por Alimentos DTAs, em várias partes do mundo, inclusive no Brasil. A salmonelose é uma das principais zoonoses para a saúde pública em todo o mundo, exteriorizando-se pelas suas características de endemicidade, alta mortalidade, sobretudo, pela dificuldade da adoção de medida no seu controle (TESSARI, 2003; LOURENÇO, 2004; SHINOHARA, 2008;)

A *Salmonella* possui ampla distribuição na natureza, sendo o principal reservatório destas bactérias o trato intestinal do homem e animais, exceto peixes, moluscos e crustáceos, os quais contaminam-se após a captura por meio de técnicas higiênicas sanitárias inadequadas e durante a manipulação. A penetração no organismo humano ou animal ocorre mediante o consumo de alimento ou água contaminados, podendo persistir de 4 a 7 dias, com sintomas de: náuseas, vômito, febre, cólicas, cefaléia e diarreia (PINTO, 2001).

A *Salmonella* sp. é frequentemente utilizada no estudo da qualidade higiênica do pescado por indicar a qualidade da água no local de captura. Barbosa (2013), em seu estudo com amostras de tilápia em filé e *in natura*, demonstrou ausência desse patógeno, estando de acordo com a legislação vigente, pois o que é preconizado pela Resolução RDC 12/2001 é ausência em 25 gramas do pescado *in natura* ou refrigerado. De acordo com Pui CF (2011), mesmo com baixa frequência em pescado comercializado, a pesquisa relativa a *Salmonella* deve ser realizada, pois as infecções causadas por esse microrganismo estão entre as principais DTAs mundiais.

2.3.3 . *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* inclui mais de 30 espécies, e aquelas de real interesse em alimentos estão listadas em 18 espécies e subespécies, sendo somente seis coagulase-positivas. Estas, geralmente, produzem nuclease termoestável (TNase), e tem, como

habitats naturais, as orelhas, o nariz e a boca; encontrados em 40 a 45% dos humanos adultos (JAY, 2005).

São cocos Gram positivos pertencentes a família Micrococcaceae e aparecem na forma de cacho de uva, facultativas anaeróbias, e com maior crescimento sob condições aeróbias, quando, produzem catalase. A espécie *S. aureus* é bactéria frequentemente as doenças estafilocócicas. Causa intoxicação provocada pela ingestão de alimento pela presença da toxina pré-formada conhecidas como enterotoxinas. A enterotoxina do tipo A é mais frequentemente associada à gastroenterite estafilocócica, os sintomas variam com o grau de suscetibilidade do indivíduo, concentração da enterotoxina no alimento e a quantidade consumida do alimento (JAY,2005; FRANCO & LANDGRAF, 2008).

A permanência de *S. aureus* em alimentos constitui uma soma de falhas higiênicas e do ajustamento de fatores ambientais, tais como, a temperatura mal controlada do armazenamento. O aquecimento do alimento logo após a sua manipulação destrói a bactéria e ajuda na prevenção da intoxicação. No entanto, se cuidados apropriados como as Boas Práticas de Fabricação não forem tomados após este aquecimento, o microrganismo poderá se desenvolver e produzir a toxina (EVAGELISTA, 2005; FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Para prevenir a proliferação é importante manter os alimentos suscetíveis sobre refrigeração, pois o resfriamento rápido de toda a massa alimentícia é uma das medidas para prevenção e controle desta intoxicação (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Conforme dados da Vigilância da Saúde, do Ministério da Saúde, entre 2000 a 2013, o *S. aureus* foi o segundo agente etiológico que mais causou surtos alimentares, ficando somente atrás da *Salmonella* sp.

Os principais alimentos envolvidos na contaminação por *Staphylococcus aureus* são os pescados, leite cru, produtos de laticínios, principalmente queijos, produtos cárneos, massas, produtos de confeitaria, preparações à base de frango, ovos e principalmente os alimentos que necessitam de muita manipulação (BRASIL, 2013).

2.3.4. *Shigella* sp.

Bactéria em forma de bacilos, Gram negativos e existem quatro espécies com sorogrupos distintos: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonnei*. Algumas especies estão intimamente relacionadas à *E.coli* patogênica. Apresenta temperatura ótima de

crescimento de 37 °C com variações de 10 °C a 40 °C. As fontes de contaminação são fezes, água e alimentos contaminados. A doença se manifesta com disenteria, desidratação e até convulsões, sendo o período de incubação do microrganismo no organismos de 4 a 7 dias (TEIXEIRA, 2009).

Diversos alimentos, incluindo o pescado tem sido também a causa de elevados surtos de shigellose. Isto tem resultado quase sempre da contaminação de alimentos crus ou previamente cozidos, durante a preparação, por um portador assintomático infectado com uma reduzida higiene pessoal. O reservatório natural da *shigella* é o trato intestinal do homem e de outros primatas. A partir do seu reservatório, principalmente por falhas higiênicas, esta bactéria pode contaminar a água e outros alimentos (HUSS, 2000; SILVA, 2000).

As infecções provocadas por este microrganismo se disseminam pela via fecal-oral, de pessoa a pessoa, por meio de mãos e objetos contaminados. Ocasionalmente água e alimentos podem constituir-se em veículos para a transmissão de *shigella*. Portanto, a shigelose está diretamente associada a condições higiênicas deficientes, principalmente em áreas de alta densidade demográfica, com infraestrutura de saneamento básico deficitário (SILVA, 2000). Muitas destas infecções podem ser evitadas pela adoção de medidas preventivas, principalmente de métodos higiênicos durante a manipulação dos alimentos. É de fundamental importância a manutenção de um adequado sistema de limpeza e sanitização, cuidadosamente executado, evitando também a presença de insetos, como as moscas e roedores nos locais destinados ao processamento de alimentos, pois as moscas são importantes veículos na disseminação desta bactéria (SILVA, 2000).

Recentemente, a biologia molecular tem sido reconhecida como uma ferramenta útil na identificação de gêneros, espécies e subespécies do grupo *Shigella* sp. A semelhança fisiológica de *Shigella* sp. com *Escherichia coli*, dificulta seu isolamento e identificação por métodos tradicionais (Peng et al., 2002).

2.4 . Detecção molecular por PCR

As novas contaminações alimentares desafiam a pensar se as técnicas de microbiologia convencional são eficientes para a detecção de bactérias em alimentos. Normalmente estes testes, nunca estão concluídos em menos de 6 dias, o que torna todo o processo demorado, perante às necessidades dos resultados conclusivos. Além disso, podem apresentar variabilidade pela ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica das bactérias,

possuem baixo poder discriminatório em microrganismos com pouca variabilidade genética e o risco de interpretações errôneas é alto, quando se utiliza um número limitado de testes, possuindo também como desvantagem o elevado custo. Como alternativa, a realização de ensaios a partir da técnica de PCR, que determina a presença/ausência destes microrganismos é a mais fácil metodologia e cada vez mais usual, sendo categorizada como métodos alternativos, segundo a Association of Official Analytical Chemists- AOAC (FARBER, 2001; PASSO, 2009).

As técnicas moleculares, têm aplicação direta na detecção e caracterização de bactérias em alimentos. São consideradas mais independentes e mais precisas que os métodos de cultivo. É possível determinar e identificar a comunidade microbiana, e a detecção de organismos específicos em amostras mais complexas, o que contribui para o aprimoramento das análises frente à necessidade de se conhecer melhor os mecanismos de detecção e remoção dos microrganismos patogênicos (MALORNY et al., 2003).

Nas últimas décadas houve um aumento significativo no desenvolvimento de metodologias moleculares para a detecção, identificação e caracterização de microrganismos patogênicos em alimentos. Avanços nos estudos de biologia molecular propiciaram o desenvolvimento e emprego de várias técnicas, tais como caracterização do DNA cromossômico, plasmidial ou total de um microrganismo, características estas relativamente estáveis o que propicia um resultado mais confiável e rápido (DESTRO, 1995).

As tecnologias moleculares têm aplicação direta na detecção e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos. Dentre essas, destacam-se, principalmente, as baseadas na amplificação de sequências do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR). O princípio desta técnica é a amplificação de um fragmento de DNA alvo de tamanho delimitado por dois *primers* específicos (Forward e Reverse) sendo amplificado pela DNA polimerase termo-estável amplificando uma sequência de nucleotídeos, possibilitando descobrir pormenores sobre a identidade do material da amostra original. A PCR tornou-se a metodologia genética mais utilizada em diagnóstico microbiológico, principalmente em alimentos essa técnica é utilizada como ferramenta para a detecção direta de microrganismos. A PCR foi criada, em 1980, por Kary Mullis permite obter milhões de cópias de um segmento específico de DNA por meio da ação da enzima *TaqDNA* polimerase, enzima obtida a partir da espécie *Thermus aquaticus* (descoberta nos anos 70 e atualmente o gene está clonado em células de *Escherichia coli*

para produção em larga escala), e de oligonucleotídeos iniciadores, os chamados *primers*, sobre um DNA molde. A PCR corresponde a execução de uma série de reações que ocorrem em diferentes temperaturas pré-estabelecidas com tempos exatos e específicos para cada fragmento de DNA a ser amplificado. A amplificação é realizada em um equipamento automatizado e computadorizado, denominado termociclador, que promove a alternância de temperaturas por determinados períodos de tempo, possibilitando a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do DNA. Os *primers* são oligonucleotídeos responsáveis por delimitar a área alvo a ser amplificada, sendo utilizados rotineiramente nas operações da PCR. Estes iniciadores são acrescentados à solução e após uma diminuição da temperatura, ocorre hibridizações com as sequências complementares presentes nas moléculas do fragmento alvo de DNA, possibilitando a identificação específica de determinados microrganismos patogênicos ou não (DESTRO, 1995; BOER & BEUMER, 1999; MALORNY et al., 2003; NAVARRO, 2012).

Para a reação de PCR, deve-se extrair o material genético da célula ou do material a ser estudado. Após, o DNA é submetido a uma mistura que contém os componentes necessários para que a duplicação ocorra. Cada ciclo é dividido em etapas bem definidas. Na primeira etapa a temperatura é elevada para que haja a separação da dupla cadeia de DNA (desnaturação). Na segunda etapa, a temperatura é reduzida para que os *primers* se pareiem com a fita molde de DNA (anelamento). Na última etapa do ciclo a temperatura é elevada para que a enzima sintetizadora (DNA polimerase) atue na extensão do *primer* e assim dar origem a uma nova molécula (extensão). Essas três etapas são executadas ciclicamente por um número definido de vezes. Diversos parâmetros tais como, o número de ciclos, a temperatura e o tempo de duração de cada etapa, bem como a qualidade e a quantidade de *primers* utilizados podem interferir na reação de PCR (KONEMAM et al., 2001).

Alguns problemas, principalmente associados à técnica de PCR, podem ocorrer devido a escolha do material analisado de peixes, que podem conter substâncias que induzem a técnica ao erro, tal como a hemoglobina, alguns componentes bacterianos e concentrações excessivas de DNA não alvo, inibindo a amplificação correta, o que pode ter um impacto significativo nos resultados do diagnóstico. Por isso, além da escolha adequada do método para o desenvolvimento da análise, o analista, deve estar ciente das condições de todo o procedimento, para distinguir falsos-negativos (GANDRA et al., 2011).

3. REFERÊNCIAS

AGNESE, A. P. et al. 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. S. et al. A. Características microbiológicas de "Pintado" (*Pseudoplatystoma fasciatum*) comercializado em supermercados e feira livre, no município de Cuiabá - MT. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 99, p. 84-88, 2002.

ALMEIDA, E. G. de. **Caracterização físico-química e microbiológica de bebidas fermentadas produzidas pelos índios Tapirapé**. 2009. 114 p. Tese. (Doutorado em Ciência dos Alimentos) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

BARBOSA, M. M. C. **Qualidade higiênico-sanitária e ocorrência de *Aeromonas* sp. E *Escherichia coli* em tilápias comercializadas no varejo**. 2013. 104p. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

BARRETO, N.S.E. et al. Avaliação das condições higiênico-sanitárias do pescado comercializado no município de Cruz das Almas, Bahia. **Revista Caatinga**, v.25, p.386-95, 2012.

BARROS, G.C. Perda da qualidade do pescado, deterioração e putrefação. **Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v.30, p.59-64, 2003.

BASTI, A.A. et al. Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. **Food Control**, v.17, p.183-188, 2006.

BOER, E.; BEUMER, R.R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 119-130, 1999.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC n.12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, 2001. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm. 2001. Acesso em: 30 Nov. 2015.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura - Brasil. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**, v.5, p.129, 2014.

Brasil. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Estatística da Pesca e Aquicultura 2010**. Disponível em <http://www.mpa.gov.br/index.php/informacoes-e-estatisticas/estatistica-da-pesca-e-aquicultura.html>. Acesso em: 17 Jan. 2015.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Estatística da Pesca e Aquicultura 2010**. Disponível em <http://www.mpa.gov.br/index.php/informacoes-e-estatisticas/estatistica-da-pesca-e-aquicultura.html>. Acesso em: 24 Fev. 2015.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Estatística da Pesca e Aquicultura 2013**. Disponível em <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2013/10/consumo-de-pescado-no-brasil-aumenta-23-7-em-dois-anos>. Acesso em: 24 Fev. 2015.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Estatística da Pesca e Aquicultura 2013**. Disponível em http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf. Acesso em: 20 Fev. 2015.

CARDOSO, T.G.; CARVALHO, V.M. Toxifecção alimentar por Salmonella spp. **Revista Instituto Ciências da Saúde**, v. 24, n.2, p. 95 – 101, 2006.

CARVALHO, I. T. **Microbiologia dos alimentos**. Recife: EDUFRPE, 2010, p. 84.

COSTA, C. et al. Calcium-alginate coating loaded with silver-montmorillonite nanoparticles to prolong the shelf life of fresh-cut carrots. **Food Res. Int.**, v. 48, p. 164-169, 2012.

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

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 652p.

FAO. Fisheries Department. **State of World aquaculture, 2006**. FAP Fisheries Technical Paper. Rome: FAO; 2006.

FARBER, J.M. et al. Molecular typing and differentiation. In: FARBER, J.M. et al. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, D.C.: APHA, v. 11, p. 127-158, 2001.

FELDHUSEN, J.F. & JARWAN, F.A. (2000). Identification of Gifted and Talented Youth for Educational Programs. In K.A. Heller, F.J. Mönks, R.J. Sternberg & R.F. Subotnik (Eds.), **International Handbook of Giftedness and Talent**. Oxford: Pergamon, v.2 p.271-282

FERREIRA, M. W. et al. Pescados processados: maior vida-de-prateleira e maior valor agregado. **Boletim de Extensão Rural**, v.1, p.25. 2002.

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

FRANCO, M.P.D.F. **HACCP em abate bovino**. Maringá – PR: PRIEPEC – Instituto de Estudos Pecuários, 2010. Disponível em: <<http://www.gadodecorte.iepec.com/noticia/haccp-em-abate-bovino>>. Acesso em: 18 Fev. 2015.

GANDRA, E.A. et al. Standardization of a multiplex PCR for the identification of coagulase-positive Staphylococcus. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.31, n.4, p. 946-949, 2011.

GOMIDE, C. A. **Estudos da Qualidade física, química e microbiológica de filés de piracanjuba (*Bryconorbignyianus Valenciennes, 1849*), submetidos a salga seca e úmida.** 2006. 100p. Tese (Doutorado em ciência dos alimentos) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

GUZMÁN, M. C. et al. Recovery of *Escherichia coli* in fresh water fish, *Jenynsia multidentata* and *Bryconamericus iheringi*. **Water Research**, v. 38, p. 2368–2374, 2004

HILSDORF, A. W. S.; PETRERE, M. J. Conservação de peixes na bacia do rio Paraíba do sul. **Revista Ciência Hoje**. v. 30, n. 180, 2002.

HUSS, H.H.; REILLY, A.; EMBAREK, P.K.B. Prevention and control of hazards in seafood. **Food Control**, v. 11, p.149-156, 2000.

INSTITUTO CENTRO DE ENSINO TECNOLÓGICO (CENTEC). **Processamento de Pescado**. Cadernos tecnológicos, Fortaleza, 2004.

JAMI, M. et al. *Listeria monocytogenes* in Aquatic Food Products- A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.13, p.143-49, 2014.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Artmed, 2005, 161p.

JESUS, R. S. et al. Comparação entre os processos de salga em salmoura e salga mista do curimatã (*Prochilodus nigricans*) na região Amazônica. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 9, n. 3, p. 143-6, 2002.

KONEMAM, E.W. et al. **Diagnóstico microbiológico**. São Paulo: Medsi, 2001, 1760p.

LANDGRAF, M. **Deterioração microbiana de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996 171p.

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.

LOURENÇO, M.C.S. et al. *Salmonella* entérica subsp *houtenae* sorogrupo O:16 em um paciente HIV positivo: relato de caso. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n.3, p.169-170, 2004.

MAIJALA R, RANTA J, SEUNA E. The efficiency of the Finnish *Salmonella* Control Programme. **Food Control**, v. 16, n.8, p.669-675, 2005.

MALORNY, B. et al. Standardization of diagnostic PCR for detection of foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiology*, v. 83, n. 1, p. 39-48, 2003.

MMA. **Biodiversidade do Cerrado e Pantanal: áreas e ações prioritárias para conservação** / Ministério do Meio Ambiente. – Brasília, 2007, 540p.

- MURATORI, M.C.S; COSTA, A.P.R.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, P.C.; PODESTÁ Jr., R.L. Qualidade sanitária de pescado “in natura”. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 116/117, p. 50-54, 2004
- NAVARRO, R. V. V; **Patógenos bacterianos da aquicultura**, 2012. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Mar e Zonas Costeiras)- Universidade de Aveiro, Aveiro,2012.
- NOVOTNY, L. et al. Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. Review Article **Veterinary Medicine**, v.49, n.9, p. 343–358, 2004.
- NUNES, M. L.et al. Aplicação do índice de qualidade (QIM) na avaliação da frescura do pescado. **Ipimar**, n.29, p. 11-6, 2007.
- PASSO, M.C. de S.U. da C. **Desenvolvimento de métodos moleculares para a avaliação da qualidade e segurança microbiológica em produtos alimentares**. 2009.53p. Dissertação (Mestrado em microbiologia aplicada) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.
- PENG, X.; LUO, W.; ZHANG, J.; WANG, S.; LIN, S. Rapid detection of *Shigella* species in environmental sewage by an immunocapture PCR with universal primers. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.5, p. 2580–2583, 2002.
- PINTO P.S.A. Aspectos sanitários da Salmonelose como uma Zoonose. **Revista Higiene Alimentar**, v.14, n.73, p.39-43, 2001.
- PUI, C.F. et al. *Salmonella*: a foodborne pathogen. **International Food Research Journal**, v. 18, p.465-73, 2011.
- RAHMAN, S. et al. Antibacterial activity of natural spices on multiple drug resistant *Escherichia coli* isolated from drinking water, Bangladesh. **AnnClin Microbiol Antimicrob**, v.10, p.1-4, 2011.
- SANTOS, C. A. M. L. **A qualidade do pescado e a segurança dos alimentos**. Simpósio de Controle do Pescado. 2006. Disponível em: ftp://ftp.sp.gov.br/ftppeca/qualidade_pescado.pdf. Acesso em: 10 Jan.2015.
- SHINOHARA, N. K. S. et al. Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1669-1674, 2008.
- SILVA, J. A. **Tópicos da Tecnologia de Alimentos**. São Paulo, Livraria Varela, 2000, 190p.
- SILVA, M.C.; NORMANDE, L.C.A.; FERREIRA, V.M.; RAMALHO, S.L. Avaliação da qualidade microbiológica do pescado comercializado em Maceió, AL. **Revista Higiene Alimentar**, v.6, n. 96, p. 60 - 64, 2002.
- TAVARES, M. et al. **Métodos sensoriais, físicos e químicos para análise de pescado**. Trabalhos apresentados em seminário sobre controle de qualidade na indústria de pescado: Leopoldianum, 1988.

TEIXEIRA, C.E. **Avaliação do efeito combinado dos processos de irradiação e atmosfera modificada na qualidade bacteriológica, físico-química e sensorial do filé de tilápia (*Oreochromis niloticus*) resfriado.** 2009. 119p. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2009.

TESSARI, E.N.C.et al. Prevalência de Salmonella enteritidis em carcaças de frango industrialmente processadas. **Higiene Alimentar**, v. 17, n.107, p.52-55, 2003.

VALLANDRO, M.J. **Avaliação da qualidade microbiológica de sashimis a base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa na cidade de Porto Alegre- RS.** 2010.64p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2010.

WHO. **How safe is your food. 2015** Disponível em: <<http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2015/en/>>. Acesso em: 25 Nov. 2011.

**CAPÍTULO 2: UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES NA QUALIDADE
MICROBIOLÓGICA DE PESCADOS COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE
CUIABÁ-MT.**

Utilização de técnicas moleculares na qualidade microbiológica de pescados comercializados no município de Cuiabá-MT.

Débora Cristina Pastro ⁽¹⁾, Erika Cerqueira Santos ⁽²⁾, Daniela Cristina Ferreira ⁽³⁾, Sandra Mariotto, ⁽¹⁾ e Gilma Silva Chitarra ⁽¹⁾

⁽¹⁾Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, Campus Cuiabá Bela Vista. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. CEP 78050-560, Cuiabá-MT.

Email: debora_pastro@hotmail.com, sandra.mariotto@blv.ifmt.edu.br, gilma.chitarra@snp.ifmt.edu.br ⁽²⁾ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, Campus Cuiabá Bela Vista. Graduação em Engenharia de Alimentos. CEP 78050-560, Cuiabá-MT. E-mail: erikaecs809@gmail.com. ⁽³⁾ Universidade Federal de Mato Grosso. Avenida Fernando Corrêa da Costa, N°2367, CEP:78060-900. E-mail: ferreiradc@yahoo.com.br.

Resumo - A crescente demanda por alimentos saudáveis e a tecnologia disponível para detecção e identificação microbiana em pescado estimularam a presente pesquisa; que teve como objetivos, identificar a comunidade bacteriana e a presença de bactérias patogênicas em amostras de espécies de pescado de ambiente natural e de cativeiro, utilizando ferramentas moleculares. Amostras de tecido muscular de peixes foram adquiridas no mercado local de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. Com uso do gene 16S (rDNA), observou-se a presença de 11 gêneros bacterianos: *Enterobacter* (29,29%); *Aeromonas* (24,24%); *Pseudomonas* (17,17%); *Enterococcus* (10,10%); *Acinetobacter* (6,06%); *Citrobacter* (4,04%); *Bacillus* (3,03%); *Klebsiella* e *Lactococcus* (2,02%); e, *Clostridium* e *Lysinibacillus* (1,01%), apresentando percentuais elevados de bactérias que diminuem a qualidade do pescado. Com a utilização de *primers* espécie específicos foram detectadas a presença das espécies de *Escherichia coli* (35,71%); *Staphylococcus aureus* (12,5%) e do gênero *Salmonella* sp. (7,14%) e ausência de *Shigella* sp., assim sendo a qualidade das amostras avaliadas não estão em conformidade com a legislação vigente. As técnicas moleculares empregadas constituem uma alternativa de diagnóstico na busca de resultados confiáveis, podendo ser utilizada em larga escala.

Termos para indexação: Bactérias, DNA, Microbiologia.

Use of molecular techniques in the microbiological quality of fish marketed in the city of Cuiabá-MT.

The increasing demand for healthy food and the technology available for detecting and identifying microbial in fish stimulated this research; which aimed to identify the bacterial community and the presence of pathogenic bacteria in samples of fish species natural environment and captivity, using molecular tools. Samples of muscle tissue of fish were purchased in the local market of Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. With use of the 16S gene (rDNA), there was the presence of 11 bacterial genera: *Enterobacter* (29.29%); *Aeromonas*

(24.24%); *Pseudomonas* (17.17%); *Enterococcus* (10.10%); *Acinetobacter*, (6.06%); *Citrobacter* (4.04%); *Bacillus* (3.03%); *Klebsiella* and *Lactococcus* (2.02%); and *Clostridium* and *Lysinibacillus* (1.01%), with high percentage of bacteria that reduce the quality of fish. With the use of primers specific species were detected the presence of the species *Escherichia coli* (35.71%); *Staphylococcus aureus* (12.5%) and the genus *Salmonella* sp. (7,14%) and absence of *Shigella* sp., So the quality of the samples are not in accordance with current legislation. Molecular techniques are employed in an alternative diagnostic search reliable results and can be used on a large scale.

Keywords: Bacteria, DNA, Microbiology.

Introdução

O Brasil é um dos países com potencial para a expansão da aquicultura e piscicultura, devido a sua alta disponibilidade de água, condições climáticas favoráveis e grandes reservatórios, que permitem a intensificação da atividade. O Estado de Mato Grosso, em 2013, obteve uma produção de 105 mil toneladas, sendo o maior produtor da região Centro Oeste (Brasil,2014).

A tendência no aumento de consumo de pescado é crescente, devido aos benefícios que o tornam um dos alimentos mais completos, especialmente pela presença de ácidos graxos poli-insaturados, como o ômega 3, alto valor proteico, fácil digestibilidade, fonte de vitaminas e aminoácidos essenciais, ferro, fósforo e cálcio. Por ser um alimento de alta qualidade nutricional e, caracteristicamente, favorecer a proliferação de microrganismos, é altamente susceptível a contaminação e deterioração.

Algumas bactérias patogênicas estão presentes naturalmente na água e no ambiente, como as espécies dos gêneros *Vibrio*, *Aeromonas* e *Clostridium*. A contaminação com bactérias patogênicas tem sido associada à contaminação fecal ou à poluição das águas, como ocorre nos casos com *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Shigella*. Essa contaminação pode ocorrer na

pré ou pós-captura do pescado, enquanto a manipulação inadequada durante o preparo pode introduzir no alimento *Staphylococcus aureus* (Onyango et al., 2009).

As técnicas convencionais de análise microbiológica para o pescado requerem tempo para detecção, risco de resultados errôneos e possuem custo elevado. O emprego de técnicas moleculares, favorecem rapidez e eficiência dos resultados, o que permite um controle mais eficaz do pescado comercializado, e pode fazer inferências na cadeia produtiva e alterações na diversidade microbiana.

Devido à crescente demanda, é imprescindível analisar a qualidade do pescado produzido no Estado de Mato Grosso, por isso, objetivou-se com esse estudo utilizar técnicas moleculares na detecção de bactérias e na qualidade microbiológica em diferentes espécies de peixes comercializados no município de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

Material e Métodos

Delineamento experimental

Experimento I. Detecção pelo Gene 16S rDNA dos gêneros de bactérias presentes em peixes de ocorrência natural e cativo. Por se tratar da avaliação da qualidade microbiológica e da identificação de gêneros de bactérias, o estudo foi realizado como Pesquisa Descritiva em um Delineamento de Levantamento. Cada amostra de tecido muscular foi considerada uma parcela experimental, totalizando 66 parcelas experimentais.

Experimento II. Detecção de bactérias patogênicas utilizando *primer* espécie específicos em espécies de peixes de ocorrência natural e de cativo. Por se tratar da avaliação da qualidade microbiológica e da identificação de espécies e gêneros de bactérias patogênicas, o estudo foi realizado como Pesquisa Descritiva em um Delineamento de Levantamento. Cada

amostra de tecido muscular foi considerada uma parcela experimental, totalizando 56 parcelas experimentais.

Coleta das amostras experimento 1

Foram adquiridos tecidos musculares de 66 amostras de peixes, sendo 26 de cativeiro e 40 de ocorrência natural, em mercados, peixarias e feiras no município de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. As espécies de peixes de cativeiro coletadas foram: tambatinga, híbrido resultante do tambaqui (*Colossoma macropomum*) com a pirapitinga (*Piaractus brachypomus*), bagre (*Pimelodus maculatus*), tambacu, híbrido resultante do tambaqui (*Colossoma macropomum*) com o pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

As espécies de ocorrência natural foram: pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), matrinxã (*Brycon cephalus*), piraputanga (*Brycon hilarii*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*). As espécies de ocorrência natural utilizadas na pesquisa são originárias da bacia do Alto Paraguai, dos rios Cuiabá e Paraguai e da bacia Amazônica sendo adquiridas junto a pescadores para uso na alimentação humana. Nenhum espécime foi removido do seu habitat ou sacrificado para esta pesquisa. Para as amostras de cativeiro, todos os locais de cultivo do pescado encontram-se na região do estudo.

As amostras de peixes frescos ou resfriados, foram acondicionados em embalagens plásticas estéreis, colocados em caixas térmicas com bolsas de gelo e encaminhados diretamente para o laboratório de genética animal da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Campus Cuiabá

Cultivo das bactérias experimento 1

Para o cultivo das bactérias utilizou a metodologia preconizada por APHA (2001) e Silva et al. (2010).

Extração de DNA experimento 1

Foi realizada a extração de DNA das colônias, através do kit de extração RTP® Bactéria DNA Mini Kit (STRATEC Molecular) e seguiu-se o protocolo de extração do fabricante. A qualidade e a integridade do DNA foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% a 120 V, com o auxílio de um transiluminador com fotodocumentador acoplado (Loccus Biotecnologia ®). A quantificação foi realizada em nanoespectrofotômetro (DeNovix ®) modelo DS-11.

Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) experimento 1

Para a amplificação da região do DNA ribossômico subunidade 16S (rDNA), foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 968 forward: 5`AAC GCG AAG AAC CTT AC 3` e 1401 reverse: 5`CGG TGT GTA CAA GAC CC 3` (Sambrook 1989).

As amplificações por PCR foram realizadas de acordo com Motlagh & Anvari (2010). Os produtos amplificados, de aproximadamente 410 pb, foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com 120 Volts/cm por 40 minutos. O gel foi corado com corante fluorescente GelRed e blue juice na proporção de 1:1 e visualizado em aparelho transiluminador com fotodocumentador acoplado (Loccus Biotecnologia ®).

Os produtos de PCR purificados, foram enviados para sequenciamento na empresa Myleus Biotechnology® (www.myleus.com), seguindo as instruções de preparo e encaminhamento das amostras.

Análise de sequência de nucleotídeos experimento 1

As sequências obtidas foram visualizadas utilizando o software Chromas Lite (v. 2.1.1). As porções iniciais e finais das sequências foram removidas mantendo os fragmentos de alta qualidade, e em seguida as sequências foram exportadas em formato FASTA e comparado com o banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), utilizando o software BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Obteve-se uma cobertura de alinhamento e identidade $\geq 72\%$ a 98%, consideradas específicas para identificação dos gêneros bacterianos. Na Tabela 1, encontra-se os respectivos números de acesso dos gêneros bacterianos, obtidas a partir do banco de dados do Genbank.

Coleta das amostras experimento 2

Foram adquiridos tecidos musculares de 56 amostras de peixes, sendo 19 de cativeiro e 37 de ocorrência natural, em mercados, peixarias e feiras no município de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. As espécies de peixes de cativeiro coletadas foram: tambatinga, híbrido resultante do tambaqui (*Colossoma macropomum*) com a pirapitinga (*Piaractus brachypomus*), bagre (*Pimelodus maculatus*), tambacu, híbrido resultante do tambaqui (*Colossoma macropomum*) com o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), lambari (*Astyanax bimaculatus*), pirarucu (*Arapaima gigas*).

As espécies de ocorrência natural foram: pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), jurupoca (*Hemisorubim platyrhynchos*), pacupeva (*Metynnis maculatus*), barbado (*Pinirampus pinirampus*), piraputanga (*Brycon hilarii*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*). As espécies de ocorrência natural e de cativeiro, são provenientes do mesmo local citado na coleta das amostras experimento 1.

Extração de DNA experimento 2

Em cada amostra do tecido muscular foi utilizado o protocolo conforme APHA, (2001); Silva et al., (2010). Não foi realizado o cultivo de bactérias do tecido muscular. As bactérias presentes em água peptonada a 0,1% foram enriquecidas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) a 35°C/18 horas e realizado extração de DNA, conforme citado em extração de DNA experimento 1.

Reação em cadeia pela polimerase (PCR) experimento 2

Os *primers* espécie específicos, foram utilizados para detecção de quatro bactérias patogênicas: *Salmonella* sp., *E. coli*, *Shigella* sp. e *Staphylococcus aureus*, descritas na Tabela 2.

As amplificações por PCR foram realizadas de acordo com Motlagh & Anvari (2010) com temperaturas de anelamento (T_m) apropriadas para cada tipo de primer espécie específico (Primer-BLAST- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Os produtos da PCR foram analisados conforme descrito em reação em cadeia pela polimerase (PCR) experimento 1, com seus respectivos controles negativos e positivos. Para o controle positivo foi utilizado cepas cedidas pelo laboratório de nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso e adquiridas na empresa New Prov ®. A visualização ocorreu em equipamento transiluminador com fotodocumentador acoplado (Loccus Biotecnologia ®). As amostras foram consideradas positivas quando seus respectivos *amplicons* produziram uma banda visível com os tamanhos medidos em pares de bases, como referido na Tabela 2.

Resultados e Discussão

Gene 16S rDNA

Todas as amostras amplificadas pelo gene 16S (rDNA), apresentaram amplicons (Figura 1).

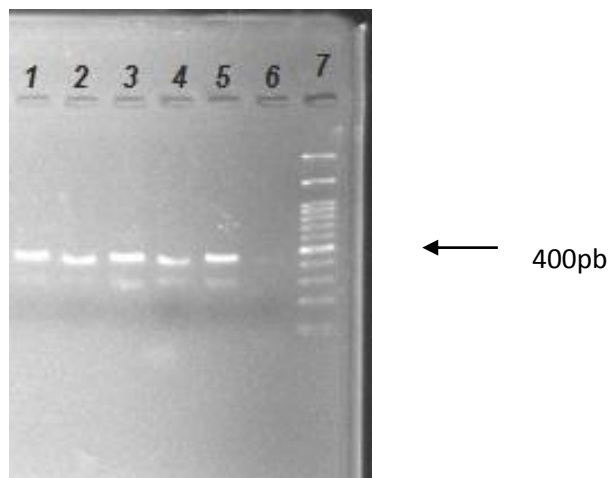


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos da reação de PCR do gene 16S rDNA (iniciadores 968F / 1401R), amplificou um produto de aproximadamente 400pb. Linha 1: controle positivo; linha 2,3,4,5: isolados positivos para o gene 16S rDNA; linha 6: controle negativo; linha 7: marcador de peso molecular 100pb.

Foram identificados 11 gêneros bacterianos e são apresentadas na Figura 2.

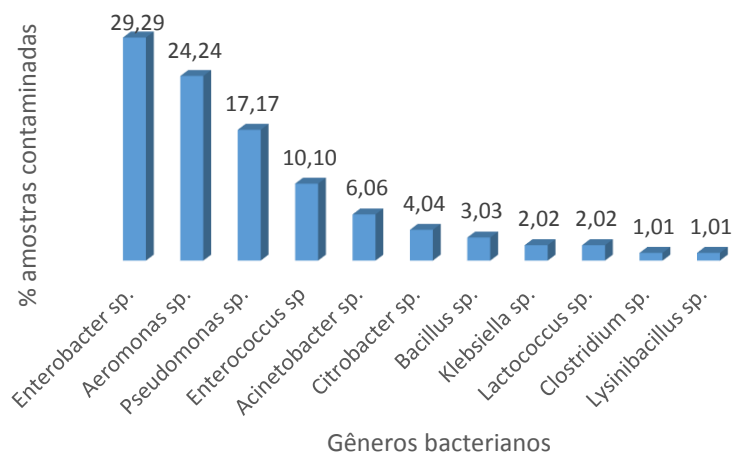


Figura 2. Bactérias detectadas pelo gene 16S rDNA em tecidos musculares de peixes de ocorrência natural e de cativeiro, e respectiva percentagem de contaminação das 66 amostras analisadas. Cuiabá – MT, 2016.

Utilizando o gene 16SrDNA, as bactérias encontradas no presente estudo, já foram detectadas em peixes provenientes dos estados de Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná e Rio de Janeiro em espécies idênticas e espécies como carpa e tilápia (Sebastião et al. 2015).

Os gêneros *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Bacillus*, *Citrobacter* sp.e *Enterobacter* sp. foram isoladas de tecidos musculares, diversos órgãos de espécies de peixes e em águas de tanques de cativeiro (Apun 1999; Yagoub 2009). Esses resultados sugerem que os mesmos gêneros bacterianos encontrados no presente estudo podem ser provenientes da contaminação do ambiente aquático, visto que é propício ao desenvolvimento bacteriano.

O gênero *Enterobacter* pertencente ao grupo de coliformes foi o mais encontrado no presente estudo (29,29%), e espécies desse gênero são amplamente distribuídas em humanos e animais, assim como na água, no esgoto e no solo e representam perigo para a saúde pública (Rajasekaran, 2012). A presença desse gênero bacteriano está associada a contaminação fecal em alimentos (Baylis et al., 2011). Assim possivelmente, as espécies de peixes em estudo podem ter sido contaminadas no ambiente aquático, decorrente do lançamento de esgotos nas águas de reservatórios e rios. Por outro lado, essas bactérias são facilmente eliminadas pelo tratamento térmico. No entanto, há uma preocupação com o consumo de peixe cru ou mal cozido, além da possibilidade de contaminação cruzada, constituindo fatores importantes para a causa de infecção ou intoxicação alimentar (Lorenzon, 2009).

Segundo FAO (2015), a manipulação indevida com medidas higiênicas sanitárias inadequadas durante o transporte, manuseio e conservação do alimento podem facilitar o

desenvolvimento de patógenos presentes no próprio pescado. Algumas bactérias isoladas de peixes nesse estudo podem ser provenientes da flora intestinal e natural dos peixes, como os gêneros de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Bacillus* (Kim et al.,2007) que, associados a falhas na manipulação desses alimentos, no momento da remoção das vísceras ou lavagem do pescado com água contaminada, determinaram a identificação das mesmas em nosso estudo. No presente estudo, quando observou-se apenas contaminação em peixes de ocorrência natural (40 amostras), relata-se 7 gêneros bacterianos: *Aeromonas* (32,08%), *Enterobacter* (22,64%), *Pseudomonas* (22,64%), *Enterococcus* (9,43%), *Acinetobacter* (5,66%), *Citrobacter* (3,77%) e *Bacillus* (3,77%) em espécies de pintado, matrinhã, cachara, piraputanga e pacu.

O gênero *Aeromonas* foi o mais encontrado nesse estudo, sendo patogênico em humanos e em peixes, e comum em ambientes aquáticos. A presença da bactéria está relacionada com o grau de poluição da água, contaminação cruzado pelos manipuladores, armazenamento, transporte e distribuição inadequada (Kirkan, 2005).

No Brasil há relatos da presença do gênero *Aeromonas* em peixes, tanto de ocorrência natural quanto de cativeiro, porém a legislação não faz referência em relação à identificação e quantificação desse patógeno em água e alimentos. Por não ser preconizado pela legislação vigente no país e rotineiramente investigado, esse patógeno é um entrave para a atividade em aquicultura, trazendo prejuízos econômicos e causando graves enfermidades aos consumidores (Martins, 2006).

Algumas bactérias, como as dos gêneros *Aeromonas* e *Pseudomonas*, estão frequentemente presentes nos tanques, pois os peixes criados nestes locais estão sujeitos à

contaminação bacteriana, pelo contato com meio ambiente, alimentos, pássaros, animais domésticos e com o próprio homem (Shama et al.,2000).

O gênero de *Enterobacter* e *Enterococcus* são considerados microrganismos indicadores de contaminação fecal. As bactérias *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp.e *Citrobacter* sp. também detectadas nesse estudo, são consideradas importante agentes de deterioração de alimentos tanto crus como processados (Baylis et al.,2011; Yagoub, 2009).

O grupo *Bacillus* foi identificado em peixes e abriga espécies patogênicas que causam gastroenterites de origem alimentar, sendo que algumas espécies são capazes de deteriorar os alimentos. Por ser uma bactéria proveniente da flora normal do pescado, em caso de manipulação inadequada pode ocorrer contaminação cruzada (Kim, et al.,2007).

A presença desses gêneros bacterianos encontrados em peixes de ocorrência natural, faz do pescado um alimento considerado como fonte potencial de bactérias patogênicas e /ou deteriorantes, e cuidados com a qualidade da água, transporte, manipulação e armazenamento são de extrema importância para minimizar riscos à saúde pública.

Os gêneros encontrados em 26 amostras de peixes de cativeiro das espécies de tambatinga, bagre e tambacu foram: *Enterobacter* sp. (35,55%), *Aeromonas* sp. (15,56%), *Pseudomonas* sp. (11,11%), *Enterococcus* sp. (11,11%), *Acinetobacter* sp. (6,67%), *Citrobacter* sp. (4,44%), *Klebsiella* sp. (4,44%), *Lactococcus* sp. (4,44%), *Clostridium* sp. (2,22%), *Lysinibacillus* sp. (2,22%) e *Bacillus* sp. (2,22%), evidenciando a diversidade da microbiota nas amostras de peixes analisados.

No presente estudo, a ocorrência dos gêneros *Klebsiella*, *Lactococcus*, *Clostridium* e *Lysinibacillus*, não foram encontradas nos peixes de ocorrência natural comparado com os peixes de cativeiro.

A *Klebsiella* sp., pertencente ao grupo de coliformes, é importante por ser uma bactéria deteriorante em alimentos. Gênero bacteriano encontrado comumente no solo e na água e quando veiculadas pelos alimentos não há conclusão sobre sua patogenicidade (Tortora et al., 2012).

Em peixes de cativeiro, a informação sobre a detecção de *Clostridium* é escassa, no entanto há relatos de *Clostridium botulinum*, considerada bactéria patogênica em peixes de água salgada (Aheroumand, 2010).

O gênero *Lactococcus* é classificado como patógeno emergentes para espécies de peixes, acarretando doenças e provocando perdas econômicas (Vendrell et al., 2006). Em relação ao gênero *Lysinibacillus* a informação de contaminação em pescado é escasso.

Para identificação de bactérias em alimentos, o método molecular utilizando o gene 16S rDNA é rápido, simples e eficiente, podendo ser utilizada em larga escala (Gever et al., 2006).

Primers espécie específico

As indústrias de alimentos necessitam de metodologias rápidas e sensíveis para monitorar a incidência de bactérias patogênicas em alimentos, principalmente em razão do fato das técnicas convencionais utilizarem de um longo período na execução e etapas laboriosas; contradizendo a urgência do controle epidemiológico. Técnicas baseadas em DNA são utilizadas na detecção e identificação de microrganismos patogênicos em alimentos.

Diante dessa perspectiva, a utilização de *primers* espécie específicos é um método rápido, sem a necessidade de cultivo bacteriano. Deste modo é possível auxiliar analisadores de rotinas laboratoriais e indústrias de alimentos (Revolledo & Ferreira, 2009).

Na Figura 3, estão apresentados a contaminação por gêneros e espécies de bactérias patogênicas em amostras de peixes de ocorrência natural e cativoiro.

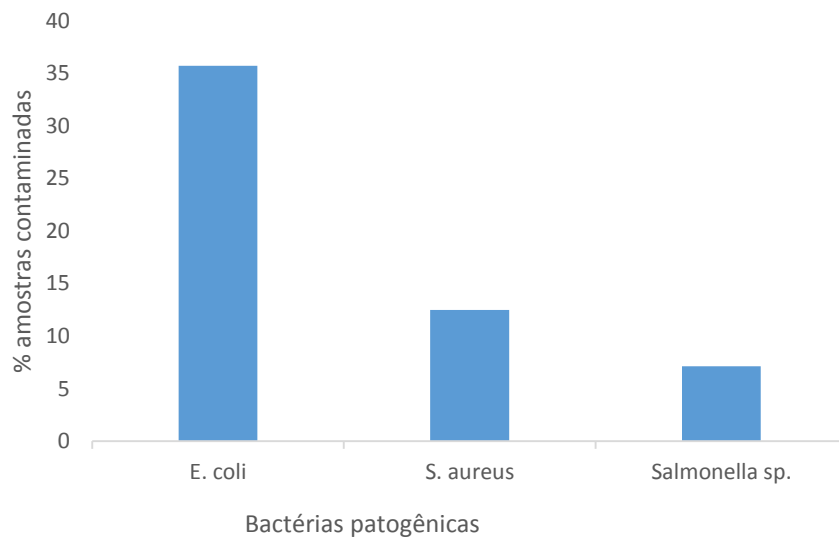


Figura 3. Bactérias patogênicas detectadas pelo uso de *primer* espécie específico em tecidos musculares de peixes de ocorrência natural e de cativoiro. Cuiabá – MT, 2016.

A bactéria *Escherichia coli* foi detectada em 20 amostras (35,71%) em um total de 56 amostras analisadas no presente trabalho, sendo destas amostras positivas, 16 de peixes de ocorrência natural e 4 amostras de peixes de cativoiro.

E. coli é o principal microrganismo indicador de contaminação fecal do alimento, não faz parte da microbiota natural do pescado. Assim, a ocorrência desta bactéria em amostras de peixes de ocorrência natural pode indicar que, de alguma forma, a água está contaminada. Essa bactéria é excretada no ambiente via esgoto doméstico, o que torna o pescado, um

importante veiculador desse agente. A incidência de bactérias patogênicas em ambientes aquáticos é de particular importância para a saúde pública, enfatizando a necessidade de tratamentos de esgoto para minimizar os impactos ambientais associados com a urbanização (Medeiros et al.,2014).

A presença de *E.coli* pode ser detectada devido a falhas em toda a cadeia produtiva do pescado, desde a produção, até o consumidor final (Onyango et al., 2009; Polimetla & Kunda, 2013).

A legislação vigente, Resolução RDC 12/2001, preconiza a ausência de *Salmonella* sp. em 25 gramas do pescado *in natura* ou refrigerado. Foi detectado *Salmonella* sp. em 4 amostras (7,14%), sendo 3 amostras de peixes de ocorrência natural e 1 de cativeiro, considerada fora dos padrões da legislação vigente (Brasil, 2001).

O gênero *Salmonella* sp. não faz parte da microbiota do pescado, sendo proveniente do trato intestinal dos animais, como as aves e quando presentes, indicam falhas durante a manipulação ou contaminação pela água (Cardoso et al., 2006).

Staphylococcus aureus foi encontrado em 7 amostras de pescado (12,5%), sendo 4 de ocorrência natural e 3 de cativeiro, sugerindo contaminação por manipulação inadequada nas etapas da cadeia produtiva do pescado em estudo.

A bactéria *Staphylococcus aureus* é proveniente de diversas fontes, como ar, água doce e salgada, solo e plantas. Em humanos é encontrada no trato respiratório, mucosas nasais e pele, podendo o alimento ser contaminado por pessoas com hábitos de higiene precários. As intoxicações alimentares são ocasionadas por vários tipos de *Staphylococcus*, mas

principalmente pelo *S. aureus* que exerce a sua ação através de toxinas pré formadas (Adams & Moss, 2008; Lorenzon, 2010).

Todas as amostras apresentaram-se negativas para *Shigella* sp.

A crescente demanda do pescado no estado de Mato Grosso, as características intrínsecas na composição, predisposição a contaminação, gastronomia local, além da vocação turística pesqueira no estado, fazem do pescado um produto alimentar de importância econômica, sendo a qualidade o fator primordial.

Conclusões

1. A técnica molecular utilizada demonstrou que tecidos musculares de pescados de ocorrência natural e de cativeiro, possuem percentuais elevados de bactérias que diminuem a qualidade do pescado e que causam deterioração e problemas de infecção /intoxicação alimentar.

2. A identificação de bactérias empregando sequências gênicas rDNA 16S e a utilização de *primers* espécie específico é rápida e viável; constituindo uma alternativa de diagnóstico na busca de resultados confiáveis, podendo ser utilizada em larga escala.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPEMAT) pela concessão da bolsa de estudos, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico MEC/SETEC/ CNPQ pelo financiamento do projeto.

Referências

- AHEROUMAND, A. Occurrence of *Clostridium botulinum* in fish and Fishery Products in Retail Trade, A Review Article. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, v.2, n.3, p.246-250, 2010.
- ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. **Food Microbiology**. Cambridge UK: Royal Society of Chemistry; 2008.
- American Public Health Association – APHA. Committee on Microbiological for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676p.
- APUN, K.; YUSOF, A.M.; JUGANG, K. Distribution of bacteria in tropical freshwater fish and ponds. **International Journal of Environmental**, v. 9, p.285-292, 1999.
- BAYLIS, C.; UYTTENDAELE, M.; JOOSTEN, H.; DAVIES, A. The enterobacteriaceae and their significance to the food industry. **ILSI Europe Report Series**, p.17-28. 2011
- BLUMER, C.; KLEEFELD, A.; LEHNEN, D.; HEINTZ, M.; DOBRINDT, U.; NAGY, G.; MICHAELIS, K.; EMÖDY, L.; POLEN, T.; RACHEL, R.; WENDISCH, V.F.; UNDEN, G. Regulation of type 1 fimbriae synthesis and biofilm formation by the transcriptional regulator LrhA of Escherichia coli. **Microbiology**, v. 151, n.10, p.3287-3298, 2005.
- BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC n.12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, 2001. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm. 2001. Acesso em: 30 Nov. 2015.
- BRASIL. **Portal Brasil**. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2014/12/maiores-produtores-de-peixes-do-brasil-nao-estao-no-litoral-e-sim-no-centro-oeste-mostra-ibge.2010>. Acesso em: 13 Set. 2015.
- CARDOSO, T.G.; CARVALHO, V.M. Toxifecção alimentar por Salmonella spp. **Revista Instituto Ciências da Saúde**, v. 24, n.2, p. 95 – 101, 2006.
- FAO. Estatísticas. 2015. Disponível em: [http:// Site Institucional: Estatísticas. \[S.l.:s.n\], 2015. Disponível em: <http:// http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5902e/x5902e01.htm>](http://SiteInstitucional:Estatísticas.[S.l.:s.n],2015.Disponívelem:<http://http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5902e/x5902e01.htm>). Acesso em: 25 Nov. 2015.
- GANDRA, E.A.; FERNANDEZ, M.A.; SILVA J, A.; SILVA, W.P. Standardization of a multiplex PCR for the identification of coagulase-positive Staphylococcus. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.31, n.4, p. 946-949, 2011.

GEVER, D.; VANDAMME, P.; WILLENS, A.; VANCANNEYZ, M.; SWINGS, J.; VOS, P. Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B. Biological Sciences*, v. 361, n.1475, p.1911-1916, 2006.

KIRKAN, S.; GOKSOY, E.O.; KAYA, O. Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative from bovine mastitis in the Aydin region of Turkey. Turkey. *Veterinary Animal Science*, v. 29, p.791-796, 2005.

KIM D.H.; BRUNT J.; AUSTIN, B. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Appl Microbiol*, v.102, p. 1654–1664. 2007.

LORENZON, C.S.; GATTI JUNIOR, P.; NUNES, A.P.; PINTO, F.R.C.; SCHOLTEN, S.N.; HONDA, L.A. Perfil microbiológico de peixes e água de cultivo em pesque-pagues situados na região nordeste do Estado de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.77, n.4, p. 617-624, 2010.

MARTINS, F.O. **Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de preparações (sushi e sashimi) a base de pescado cru servidos em bufês na Cidade de São Paulo**. 2006.142p. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo.

MEDEIROS, J.D.; ARAÚJO, L.X.; SILVA, V.L.; DINIZ, C.G.; CESAR DE DEL'DUCA, A.; COELHO, C. M. Characterization of the microbial community in a lotic environment to assess the effect of pollution on nitrifying and potentially pathogenic bacteria. *Brazilian Journal of Biology*, v. 74, n. 3, p. 612-622, 2014.

MOTLAGH, M.R.S & ANVARI, M. Genetic variation in a population of *Bipolaris oryzae* based on RAPD-PCR in north of Iran. *African Journal of Biotechnology*, v.9, p.5800-5804, 2010.

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

POLIMETLA, B.; KUNDA, S.K. Prevalence of *Escherichia coli* in food fishes assessed from domestic retail fish market, Guntur city, Andhra Pradesh, India: a case study. *International Journal of Engineering Science and Technology*, v.5, n.7, p.1545-52, 2013.

RAJASEKARAN, P. Enterobacteriaceae group of organisms in sewage-fed fishes. *Biotechnology Advances*, v. 8, p.12-14, 2012.

REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia aviária**. Barueri: Manole; 2009.

SAMBROOK, J.; Edward, F.F.; Tom, M. **Molecular cloning**. New York: Cold spring harbor laboratory press, v.2, p.14-9, 1989.

SEBASTIÃO, F.A.; FURLAN, L.R.; HASHIMOTO, D.T.; PILARSKI, F. Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene sequencing. **Advances in Microbiology**, v.5, p.409-424, 2015.

SHAMA, S.; BRANDÃO, D.A.; VARGAS, A.C.; COSTA, M.M.; PEDROZO, A.F. Bactérias com potencial patogênico nos rins e lesões externas de jundiás (*Rhamdia quelen*) cultivados em sistema semi-intensivo. **Ciências Rural**, v.30, n.2, p. 293-298, 2000.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, C.; SILVEIRA, A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela; 2010.

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

SUH, D.K.; SONG, J.C. Simultaneous detection of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* spp. in swine intestinal specimens by multiplex polymerase chain reaction. **Journal of veterinary science**, v.6, n.3, p. 231-237, 2005.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Livraria Artmed; 2012.

YAGOUB, S.O. Isolation of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. from raw fish sold in fish market in Khartoum state. **Journal of Bacteriology**, v. 1, n.7, p.85-88, 2009.

Tabela 1. Gêneros bacterianos e seus respectivos números de acesso.

Identificação	Número de acesso GenBank
<i>Acinetobacter</i> sp.	KF681154.1
<i>Aeromonas</i> sp.	KR189942.1
<i>Bacillus</i> sp.	KR265687.1
<i>Citrobacter</i> sp.	JN987149.1
<i>Clostridium</i> sp.	JF312732.1
<i>Enterobacter</i> sp.	KM032850.1
<i>Enterococcus</i> sp.	KF000371.1
<i>Klebsiella</i> sp.	JF501149.1
<i>Lactococcus</i> sp.	KM596908.1
<i>Lysinibacillus</i> sp.	KC310819.1
<i>Pseudomonas</i> sp.	KF681154.1

Tabela 2. Desenho dos *primers* espécie específico de acordo com os respectivos autores.

Bactéria	Desenho do primer	Peso molecular	Gene	Fonte
<i>S. aureus</i>	F:5' -ATG AAG TCA AAT AAA TCG CT-3'	458 pb	nuC	Gandra et al. (2011)
	R:5' -TTT GGT GAA AAA TAC TTC TC-3'			
<i>Salmonella</i> sp.	F:5' -TTG GTG TTT ATG GGG TCG TT-3'	298 pb	invA	Suh & Song (2005)
	R:5' -GGG CAT ACC ATC CAG AGA AA-3'			
<i>Escherichia coli</i>	F: 5' -GTT GTC GCT GAA GCA ACT GG-3'	171 pb	gapA	Blumer (2005)
	R:5' - AGC GTT GGA AAC GAT GTC CT-3'			
<i>Shigella</i> sp.	F:5'- GTTCCCTTGACCGCCTTTCCGATAACCGTC3'	620 pb	ipaH	Song et al. (2005)
	R:5' -GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC-3'			

ANEXO I: NORMAS PARA SUBMISSÃO DA REVISTA PESQUISA

AGROPECUÁRIA BRASILEIRA

Diretrizes para Autores

A revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) é uma publicação mensal da Embrapa, que edita e publica trabalhos técnico-científicos originais, em português, espanhol ou inglês, resultantes de pesquisas de interesse agropecuário. A principal forma de contribuição é o Artigo, mas a PAB também publica Notas Científicas e Revisões a convite do Editor.

Análise dos artigos

A Comissão Editorial faz a análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como escopo, apresentação do artigo segundo as normas da revista, formulação do objetivo de forma clara, clareza da redação, fundamentação teórica, atualização da revisão da literatura, coerência e precisão da metodologia, resultados com contribuição significativa, discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura, qualidade das tabelas e figuras, originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério é aplicado somente aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

Forma e preparação de manuscritos

Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos (não terem dados – tabelas e figuras – publicadas parcial ou integralmente em nenhum outro veículo de divulgação técnico-científica, como boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas etc.) e não podem ter sido encaminhados simultaneamente a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

- São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.

- Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.

- O texto deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, com margens de 2,5 cm e com páginas e linhas numeradas.

Informações necessárias na submissão on-line de trabalhos

No passo 1 da submissão (Início), em “comentários ao editor”, informar a relevância e o aspecto inédito do trabalho.

No passo 2 da submissão (Transferência do manuscrito), carregar o trabalho completo em arquivo Microsoft Word.

No passo 3 da submissão (Inclusão de metadados), em “resumo da biografia” de cada autor, informar o link do sistema de currículos lattes (ex.: <http://lattes.cnpq.br/0577680271652459>). Clicar em “incluir autor” para inserir todos os coautores do trabalho, na ordem de autoria.

Ainda no passo 3, copiar e colar o título, resumo e termos para indexação (key words) do trabalho nos respectivos campos do sistema.

No passo 4 da submissão (Transferência de documentos suplementares), carregar, no sistema on-line da revista PAB, um arquivo Word com todas as cartas (mensagens) de concordância dos coautores coladas conforme as explicações abaixo:

Como fazer:

Peça ao coautor que lhe envie um e-mail de concordância, encaminhe-o para o seu próprio e-mail (assim gerará os dados da mensagem original: assunto, data, de e para), marque todo o email e copie e depois cole no arquivo word. Assim, teremos todas as cartas de concordâncias dos co-autores num mesmo arquivo.

Organização do Artigo Científico

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

- Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.

- Artigos em inglês - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.

- O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.

- O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

Título

- Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.

- Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.

- Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como “efeito” ou “influência”.

- Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.

- Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.

- As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

Nomes dos autores

- Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção “e”, “y” ou “and”, no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.

- O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

Endereço dos autores

- São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.

- Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.

- Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

Resumo

- O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.

- Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.

- Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão.

- Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.

Termos para indexação

- A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
- Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.
- Não devem conter palavras que componham o título.
- Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.

Introdução

- A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.
- O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

Material e Métodos

- A expressão Material e Métodos deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
- Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.
- Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.
- Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.
- Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.
- Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.
- Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.

- Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

Resultados e Discussão

- A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

- Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.

- As tabelas e figuras são citadas seqüencialmente.

- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores.

- Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.

- Dados não apresentados não podem ser discutidos.

- Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.

- As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.

- Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.

- As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

Conclusões

- O termo Conclusões deve ser centralizado e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

- Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo.

- Devem ser elaboradas com base no objetivo do trabalho.

- Não podem consistir no resumo dos resultados.

- Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.

- Devem ser numeradas e no máximo cinco.

Agradecimentos

- A palavra *Agradecimentos* deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser breves e diretos, iniciando-se com “Ao, Aos, À ou Às” (pessoas ou instituições).
- Devem conter o motivo do agradecimento.

Referências

- A palavra *Referências* deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.
- Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
- Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
- Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
- Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
- Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

- Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. Anais.Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

- Artigos de periódicos

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, p.67-75, 2006.

- Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). O agronegócio da mamona no Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

- Livros

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

- Teses

HAMADA, E. Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: Acesso em: 18 abr. 2006.

Citações

- Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados. - A autocitação deve ser evitada. - Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.

- Redação das citações dentro de parênteses

- Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.

- Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.

- Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.

- Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.

- Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.

- Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão “citado por” e da citação da obra consultada.
- Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.
- Redação das citações fora de parênteses
- Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

Fórmulas, expressões e equações matemáticas

- Devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.
- Não devem apresentar letras em itálico ou negrito, à exceção de símbolos escritos convencionalmente em itálico.

Tabelas

- As tabelas devem ser numeradas sequencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências.
- Devem ser auto-explicativas.
- Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.
- Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.
- O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.
- No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.
- Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.
- Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.
- Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.

- Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.
- Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.
- As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.
- Notas de rodapé das tabelas
- Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.
- Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.
- Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); * e ** (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

Figuras

- São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.
- Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.
- O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.
- Devem ser auto-explicativas.
- A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.
- Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.
- Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.

- O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração. - As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.
- Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).
- Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.
- As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.
- Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.
- Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções.
- No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).
- Não usar negrito nas figuras.
- As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.
- Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

Outras informações

- Não há cobrança de taxa de publicação.
- Os manuscritos aprovados para publicação são revisados por no mínimo dois especialistas.
- O editor e a assessoria científica reservam-se o direito de solicitar modificações nos artigos e de decidir sobre a sua publicação.
- Os trabalhos aceitos não podem ser reproduzidos, mesmo parcialmente, sem o consentimento expresso do editor da PAB.

Contatos com a secretaria da revista podem ser feitos por telefone: (61)3448-4231, via e-mail: sct.pab@embrapa.br ou pelos correios:

Embrapa Informação Tecnológica Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB

Caixa Postal 040315 CEP 70770 901 Brasília, DF