



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

TILÁPIA (*Tilapia rendalli*) COMERCIALIZADA NA CIDADE DE SÃO LUÍS: AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE COLIFORMES E DO PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE *Escherichia coli*

SÃO LUÍS – MA

2016



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO

ALINE RODRIGUES DE ARAUJO

TILÁPIA (*Tilapia rendalli*) COMERCIALIZADA NA CIDADE DE SÃO LUÍS: AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE COLIFORMES E DO PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE *Escherichia coli*

Monografia apresentada ao curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) como requisito parcial para obtenção de título de Médica Veterinária

Orientadora Profa. Dra. Isabel Azevedo Carvalho

SÃO LUÍS – MA

2016

Aos meus pais,
Everaldo Rabelo e Doralice Rodrigues

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu pai, amigo, Senhor e autor da minha vida e da minha fé por ser um Deus tão grande e me amar mesmo sendo tão pequena e pecadora, por não desistir de mim mesmo quando eu mesma já não acreditava mais, por realizar em minha vida os seus sonhos e por não me abandonar nem um único instante.

Ao meu pai Everaldo Rabelo, o meu maior exemplo de perseverança, fé, amor, companheirismo e amizade, pelas nossas conversas e sábios conselhos que me guiam para fazer as melhores escolhas na minha vida. A minha mãe Doralice Rodrigues, a mais doce, sensível e sábia mulher, anjos que Deus me deu como pais, obrigada por muitas vezes deixarem de viver os seus sonhos para que eu pudesse viver os meus, pelos sacrifícios que demonstraram o quanto me amam. Eu me formarei como médica veterinária, mas a maior de todas as minhas formações é como pessoa, e na universidade da vida vocês são os meus melhores mestres. Eu vos amo.

Ao meu irmão Alexandre Rodrigues pelo privilégio de dividir com você todos os melhores anos da minha vida e saber que sempre poderei contar com você não importando onde estivermos. O nosso laço vai muito além do sangue, é de amor e amizade e irá para sempre nos unir. Te amo Xande.

À minha querida orientadora Profª. Dra. Isabel Azevedo Carvalho pela orientação, carinho, ensinamentos e paciência a mim desprendidos, para me formar uma construtora de conhecimentos e não só replicadora dos mesmos.

Aos meus queridos amigos Davi Teixeira, Pablo Sousa e Lissa Castro, com vocês aprendi o verdadeiro significado da palavra amizade, que não importa o que estivermos passando, mas sempre temos um tempinho para doar aos amigos. Obrigada por todos os bons e tristes momentos divididos ao meu lado e por tornar essa caminhada mais alegre, pelos sorrisos e choros compartilhados, pelos lanches e pelas palavras de incentivo. Eu amo vocês!

À Profª. Dra. Lenka de Moraes Lacerda e à mestrande Karina Silva Cordeiro, por terem aceitado o convite para participar da banca e por suas sugestões para melhorar este trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para realização dessa pesquisa, muito obrigada.

"Sabemos que todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito"

(Romanos 8:28)

RESUMO

Coliformes totais são enterobactérias que fermentam a lactose, com produção de gás, quando incubadas a 35°C por 24 a 48 horas. Neste grupo estão principalmente os gêneros *Escherichia*, *Klebsiela*, *Enterobacter* e *Citrobacter*. A presença de *Escherichia coli* é um indicador específico de contaminação fecal recente e da provável presença de bactérias patogênicas. Coliformes termotolerantes são capazes de fermentar a lactose, com produção de gás em 24 a 48 horas a 45°C. O principal representante deste grupo é a *Escherichia coli* de origem fecal. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a susceptibilidade *in vitro* de *Escherichia coli* isolada de tilápia (*Tilapia rendalli*) comercializada na cidade de São Luís - MA. A pesquisa foi realizada pela técnica dos tubos múltiplos (Número Mais Provável), a partir de diluições decimais. Para pesquisa de *Escherichia coli* foram realizados esfregaços corados pelo método de Gram e confirmação por testes bioquímicos. A susceptibilidade *in vitro* a antimicrobianos foi, realizada pelo método de difusão de discos em placas contendo meio ágar Muller Hinton. Houve diferenças estatisticamente significativas entre as médias de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C entre feiras e supermercados. Nas feiras, os NMP/g foram superiores em relação aos encontrados nos supermercados. Nas dez amostras de feiras foram encontradas sete cepas de *Escherichia coli* e nas vinte de supermercado, zero. Uma cepa foi resistente ao antimicrobiano ampicilina, duas apresentaram resistência intermediária aos antimicrobianos ampicilina e ácido clavulânico + amoxicilina. Estes resultados podem ser resultado da utilização de antimicrobianos na criação dos peixes.

Palavras-chave: pescado, análise, supermercados, feiras.

ABSTRACT

Total coliforms are enterobacteria that ferment lactose, with gas production, when incubated at 35 ° C for 24 to 48 hours. In this group are mainly *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Citrobacter* genera. The presence of *Escherichia coli* is a specific indicator of recent fecal contamination and the likely presence of pathogenic bacteria. Fecal coliforms are able to ferment lactose, with gas production in 24 to 48 hours at 45°C. The main representative of this group is the *Escherichia coli*, from faecal origin. This study aimed to evaluate the *in vitro* susceptibility of *Escherichia coli* isolated from tilapia (*Tilapia rendalli*) marketed in the city of São Luís - MA. The survey was conducted by the technique of multiple tube (most probable number) from decimal dilutions. For research of *Escherichia coli* we were performed smears stained by the Gram method and confirmed by biochemical tests. The *in vitro* susceptibility to antimicrobial was held by plates disk diffusion method in Muller Hinton agar. Between the means for coliforms at 35°C and coliforms at 45°C were found statistically significant differences. On fairs the NMP-/-g were higher than that found in markets. On the ten fair samples were found seven strains of *Escherichia coli* and on twenty supermarket samples, zero. One strain was resistant to antibiotic ampicillin, two showed intermediate resistance to antibiotics ampicillin and amoxicillin + clavulanic acid. It may result from use of antimicrobials in fish breeding.

Key words: fish, analysis, supermarkets, fairs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Peixes expostos à venda em mercado: melhores condições de refrigeração.....	20
Figura 2. Peixes expostos à venda em feira: bancada de azulejos, sem refrigeração	20
Figura 3. Placa com colônia sugestiva de <i>E. coli</i> com coloração verde metálico.....	21
Figura 4. Lâmina corada pela coloração de Gram (1000x) contendo bacilos Gram-negativos	22
Figura 5. Resultado de uma amostra no teste IMViC, confirmando <i>E. coli</i>	22
Figura 6. Cultura de <i>E.coli</i> inoculada em ágar Mueller Hinton adicionado de discos antimicrobianos.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Determinação de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e presença de <i>E. coli</i> em amostras de filés de tilápia em trinta locais de coleta (feiras e mercados) de São Luís - MA, 2016	18
Tabela 2. Resultados dos testes de sensibilidade antimicrobiana	25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVOS	6
2.1. Geral	6
2.2. Específicos	6
3. REVISÃO DE LITERATURA	7
3.1. Produção Aquícola.....	7
3.2. Ponto de Vista Nutricional.....	7
3.3. Avaliação da Qualidade do Pescado.....	8
3.4. Saúde Pública.....	9
3.5. Métodos de Conservação do Pescado.....	10
3.6. Coliformes e <i>Escherichia coli</i>	10
3.7. Resistência Antimicrobiana.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Amostras	13
4.2. Análises Microbiológicas.....	13
4.3. Susceptibilidade <i>in vitro</i> de isolados de <i>E. coli</i> frente aos antimicrobianos	16
4.4. Análise Estatística	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
6. CONCLUSÃO.....	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

1. INTRODUÇÃO

O Brasil dispõe de todas as condições favoráveis para a atividade pesqueira e para a aquicultura, uma vez que possui uma costa marítima de 8.500 km e 13% da água doce disponível no planeta. Entre 2007 e 2010, a produção aquícola de espécies exóticas representou 65% do total produzido pela piscicultura brasileira. Esse predomínio se deve muito ao fato de espécies como a tilápia, já possuírem uma cadeia produtiva estruturada e um vasto desenvolvimento tecnológico, resultando assim, em menor custo de produção, oferta de peixes com qualidade e preços acessíveis (ROCHA et al., 2013).

Conforme a Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura), aquicultura é a produção de organismos aquáticos como peixes, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas, abrangendo o cultivo em água doce e em água salgada de organismos em que envolva um espaço confinado e controlado (SEBRAE, 2015).

Apesar de possuir elevada importância do ponto de vista nutricional, depois de capturado, o pescado deteriora gradualmente, pois é um alimento altamente perecível dentre os produtos de origem animal. Principalmente por apresentar: pH próximo à sua neutralidade; elevada quantidade de água disponível para os micro-organismos; elevado teor de nutrientes; alto teor de ácidos graxos poli-insaturados; estrutura muscular com menor barreira física de proteção quando comparada à estrutura muscular do bovino, por exemplo; baixa quantidade de tecido conjuntivo; rápida ação destrutiva das enzimas endógenas e exógenas presentes nos tecidos e nas vísceras; estresse acentuado no momento da captura, levando a uma rápida instalação do *rigor mortis*, entre outros fatores intrínsecos e extrínsecos, que levam ao aumento da susceptibilidade deste grupo alimentar ao processo de deterioração (SILVA et al., 2002).

Entretanto por si tratar de um produto altamente perecível, a refrigeração deve ocorrer logo após sua captura, isto é, nos próprios barcos, nos meios de transporte, nos postos de venda, nos locais de breve consumo e nos recintos à espera de sua transformação industrial para prolongamento de sua vida útil máxima (EVANGELISTA., 1998). A refrigeração é efetiva no pescado se este estiver refrigerado dentro de 1 hora após sua morte, pois as bactérias dos pescados de zonas tropicais são predominantemente mesofílicas. O gelo, no entanto, está susceptível à contaminação por microrganismos psicotróficos (OETTERER, 1999).

Tilapia rendalli é uma importante espécie introduzida no Brasil, sendo importada do Congo em 1953. Uma das principais espécies mais cultivadas em todo o mundo, se adapta aos sistemas de cultivo mais extensivo até os mais intensivos, por possuir diversos fatores favoráveis: a sua grande capacidade de adaptação; a elevada resistência a doenças; rápido desenvolvimento; pequeno requerimento energético e alta aceitabilidade pelo mercado consumidor. Assim, esta espécie ocupa, atualmente, o terceiro lugar no ranking mundial de peixes produzidos em cativeiro. E sua produção continua crescendo uma vez que o mercado consumidor de tilápia aumentou principalmente nos países desenvolvidos. (OLIVEIRA et al., 2007). A produção de tilápia no ano de 2015, na cidade de São Luís – MA foi 4.350 Kg com o valor de produção 37 mil reais (IBGE, 2015).

O consumidor brasileiro segue a tendência mundial de consumo de alimentos mais saudáveis. Deste modo, o pescado assume destaque pelo seu alto valor proteico e baixo teor em gordura participando cada vez mais na dieta da população. Ressalta-se, entretanto, que o pescado geralmente chega ao consumidor com uma carga microbiana elevada. Assim, apesar de inúmeras vantagens o pescado é um alimento altamente perecível, exigindo cuidados com seu manuseio e processamento, desde a captura até a chegada à mesa do consumidor. Segue a importância da avaliação da qualidade do pescado, através de métodos de análise microbiológica, além do controle contínuo da Vigilância Sanitária nos pontos de venda garantindo que o consumidor venha adquirir um alimento com qualidade.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Avaliar o perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Escherichia coli* isolada de amostras de tilápia (*Tilapia rendalli*) comercializadas na cidade de São Luís – MA.

2.2. Específicos

- Quantificar coliformes a 35°C e 45°C;
- Comparar os resultados NMP/g de coliformes em feiras e supermercados de São Luís – MA;
- Pesquisar *E. coli*;
- Avaliar a susceptibilidade *in vitro* de *E. coli* a antimicrobianos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Produção Aquícola

Atualmente, a aquicultura é responsável pela produção da metade dos peixes e moluscos consumidos pela população mundial. Segundo os dados disponíveis, a produção de peixes por meio da aquicultura triplicou entre 1995 e 2007. (SEBRAE, 2015).

O cultivo de peixes no mundo intensificou-se, principalmente, para atender a demanda alimentar devido ao aumento populacional nas últimas décadas. Com isso, diversas espécies de peixes foram introduzidas em todo o mundo para a criação de novas áreas pesqueiras, levando ao aumento dos rendimentos comerciais e instituição da aquicultura (GOZLAN et al., 2002).

A produção mundial do pescado (proveniente tanto da pesca extrativa quanto da aquicultura) atingiu aproximadamente 146 milhões de toneladas em 2009 e 148 milhões de toneladas em 2010 (FAO, 2013). Os maiores produtores aquícolas em 2010, foram a China com aproximadamente 36,7 milhões de toneladas, a Índia com 4,65 milhões de toneladas e o Vietnã com 2,67 milhões de toneladas (FAO, 2012).

No Brasil, a aquicultura é um setor relativamente novo, porém apresenta grandes perspectivas de expansão devido a uma série de condições favoráveis ao seu desenvolvimento, como a vasta área territorial, farta disponibilidade de água doce, extensa orla marítima, condições climáticas propícias, grande produção de grãos, principal matéria-prima das rações e mercado consumidor crescente (FAO, 2012).

Os principais fatores que contribuem para o potencial de exploração aquícola das tilápias são: aceitam proteína de origem vegetal; são resistentes ao manejo, altas densidades e baixos níveis de oxigênio; possuem bom desempenho produtivo, alcançando de 600 a 800 gramas entre 4 e 6 meses de cultivo; os alevinos são produzidos durante todo o ano; aceitam uma amplitude de temperatura, podem ser cultivadas em temperaturas de 15°C a 32°C, sendo o intervalo ideal entre 26°C e 30°C; podem ser cultivadas em água salobra com salinidade até 20 ppm (SEBRAE, 2015).

3.2. Ponto de Vista Nutricional

O princípio “deixe o alimento ser teu remédio e o remédio ser teu alimento” foi exposto por Hipócrates há 2.500 anos e este fundamento tem sido observado em diversos trabalhos e estudos nos últimos anos. Antes, comia-se para sobreviver, de forma que a

qualidade não era prioridade. Durante as últimas décadas a preocupação do consumidor em relação à qualidade dos alimentos cresceu consideravelmente, tornando-os sinônimos de bem-estar e de redução de riscos de doenças assim como veículos de uma melhor qualidade de vida. Daí a aceitação de alimentos funcionais, reforçando a ideia de que a alimentação é um fator crítico para a manutenção da saúde (PIEDADE, 2007).

A qualidade do pescado como alimento é indiscutível, uma vez que é uma importante fonte de proteínas e lipídeos. De maneira geral, o pescado está sendo cada vez mais procurado, já que pode estar presente nos mais variados tipos de dietas e possui qualidades nutricionais para combater, ao mesmo tempo, dois problemas contemporâneos, a fome e a obesidade. A recomendação para a ingestão de pescado é de, pelo menos, duas vezes por semana. No entanto, o consumo é fortemente dependente de fatores como os ligados ao hábito e aos aspectos econômicos que envolvem a oferta e demanda em cada região de produção. O pescado é geralmente pobre em gorduras saturadas, carboidratos e colesterol e proporciona não só proteínas de alto valor, mas também uma ampla gama de micronutrientes essenciais, incluindo várias vitaminas, minerais e ácidos graxos poli-insaturados da série ômega-3 (FAO, 2012).

A percentagem comestível do pescado oscila entre 30% e 60% variando segundo a espécie e o tipo de beneficiamento ao qual é submetido, sendo composta por 60% a 85% de umidade; aproximadamente 20% de proteína bruta, 1% a 2% da fração cinza e 0,6% a 36% de lipídeos (OGAWA; MAIA, 1999). Apresenta proteínas de alto valor nutritivo, por conter um perfil completo de aminoácidos, principalmente de aminoácidos essenciais, tais como a lisina, aminoácido *starter* do processo digestivo e necessário na dieta brasileira à base de arroz. A carne de pescado é notadamente uma excelente fonte de proteínas de alta digestibilidade, cerca de 90 a 95%, por possuir baixo teor de tecido conectivo, superando a carne bovina, que atinge valores ao redor de 90% além do valor biológico próximo de 100, determinado pela alta absorção dos aminoácidos essenciais (CONTRERAS-GUZMÁN, 1994; CRAWFORD, 1985; MORETTO et al., 2002; OETTERER, 2006; RUITER, 1995; SGARBIERI, 1996).

3.3. Avaliação da Qualidade do Pescado

Na avaliação de qualidade do pescado, produtos em condições satisfatórias são aqueles cujos resultados analíticos estão abaixo ou igual à amostra representativa, significando isto que os resultados devem ser condizentes com os padrões estabelecidos na legislação: os que estão acima dos limites estabelecidos podem mostrar a presença ou a

quantificação de microrganismos patogênicos ou suas toxinas, que representam riscos à saúde do consumidor (DAMS et al., 1996; JAKABI et al., 1999; PINTO, 2001).

Todos os tipos de produtos de pescado precisam estar com sua microbiota contaminante dentro dos limites impostos pela legislação, sob pena de não poder ser comercializado e/ou exportado (GUIMARÃES et al., 2001; MOURA et al., 2003).

O controle de qualidade engloba avaliações, através de análises, inspeções e ensaios, das características dos produtos, matérias-primas ou insumos, comparando-os a padrões de conformidade. A garantia de qualidade envolve controle de processos, e não de produtos, com o objetivo de evitar qualquer tipo de contaminação ou defeito de matéria-prima, ou seja, é uma abordagem preventiva da qualidade, na medida em que se busca minimizar ou eliminar os riscos (LOPES et al., 2005).

Além disso, na avaliação de qualidade do pescado dispensa-se a colheita de amostras para análise laboratorial quando o produto estiver deteriorado e/ou alterado, traduzindo-se por alterado ou deteriorado aquele que apresenta alteração e/ou deterioração física, química e ou organoléptica (GONÇALVES E HERNANDES, 1998).

3.4.Saúde Pública

As doenças transmitidas por alimentos representam um importante problema de saúde pública por acometerem milhões de pessoas em todo o mundo. No entanto, se faz necessária a análise de risco no setor pesqueiro, destacando-se etapas que vão desde a captura à comercialização, atualmente os patógenos emergentes são os principais contribuintes para as doenças carreadas pelos alimentos. Além disto, o risco microbiológico é um dos itens mais avaliados pela indústria de processamento do pescado visando à segurança alimentar. Entre os principais patógenos associados ao pescado, citam-se: *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia enterocolitica*, *Norwalk-like vírus*, *Rotavirus*, *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia* (GONÇALVEZ E SOARES, 2012).

Para tanto, segundo o artigo 442 do RIISPOA o pescado fresco próprio para o consumo deverá apresentar as seguintes características organolépticas: superfície do corpo limpa, com relativo brilho metálico; olhos transparentes, brilhantes e salientes, ocupando completamente as órbitas; guelras róseas ou vermelhas, úmidas e brilhantes com odor natural, próprio e suave; ventre roliço, não deixando impressão duradoura à pressão dos dedos; escamas brilhantes, bem aderentes à pele e nadadeiras apresentando certa resistência aos

movimentos provocados, não viscosas; carne firme, consistência elástica, de cor própria à espécie; vísceras íntegras, perfeitamente diferenciadas; ânus fechado e cheiros específicos, lembrando o das plantas marinhas (CAMPOS E PAIVA, 2012).

3.5.Métodos de Conservação do Pescado

O pescado é um produto que se decompõe rápido. Todavia sua velocidade de deterioração depende de alguns fatores, como: temperatura; métodos de captura; espécie de peixe trabalhada, manuseio e dentre outros. Assim, a conservação do pescado tem por finalidade retardar o processo de deterioração, aumentando seu tempo de prateleira. Para isso, são utilizados alguns meios como o congelamento, defumação, resfriamento, salga, dentre outros (BEIRÃO et al, 2004).

O frio é o agente que melhor vai frear as reações enzimáticas e inibição da ação bacteriana, ainda que temporariamente. Na forma de gelo, a temperatura diminui, mas não se mantém constante. Conforme o gelo vai descongelando, a temperatura vai aumentando. Nas feiras, quando o pescado não é vendido, ele é mantido no refrigerador, voltando à banca no dia seguinte, bem mais vulnerável à ação microbiana e enzimática (OGAWA e MAIA, 1999). Práticas de higiene adequadas por parte dos manipuladores têm importância fundamental na conservação e preservação da qualidade do pescado, considerando que o homem é veículo de microrganismos responsáveis pelas doenças alimentares (PARANÁ, 1993).

Procedimentos tecnológicos empregados imediatamente após a captura, como manuseio adequado, lavagem e evisceração interferem na conservação e melhoram a capacidade de manutenção da estabilidade do pescado. Conservar estes produtos requer rigoroso controle de qualidade desde a captura até a comercialização (CARDOSO et al., 2003).

3.6.Coliformes e *Escherichia coli*

Os coliformes totais são bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos. Este grupo é composto por bactérias da família Enterobacteriaceae, capazes de fermentar a lactose com produção de gás quando incubadas à temperatura de 35°C, por 24 a 48 horas. São comensais e são importantes na manutenção da fisiologia intestinal (FRANCO E LADGRAF, 2008).

Por ser um grupo formado por diversos gêneros encontrados naturalmente no meio ambiente, a presença de coliformes totais no alimento não indica necessariamente

contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos, mas pode indicar as condições de higiene de alimentos frescos ou processados. O grupo dos coliformes termotolerantes é um subgrupo dos coliformes totais, restrito aos membros capazes de fermentar a lactose em 24 a 48 horas a 45°C, com produção de gás (JAY, 2005).

As bactérias do grupo coliformes são consideradas como microrganismos indicadores. A denominação de microrganismo indicador pode ser aplicada a qualquer grupo taxonômico, fisiológico ou ecológico de microrganismos, que quando presente em determinados alimentos proporciona uma evidência indireta referente a uma característica particular do histórico da amostra, podendo ser indicador de condições sanitárias inadequadas de produção e manipulação de alimentos (GEUS E LIMA, 2008).

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

3.7. Resistência Antimicrobiana

Os antimicrobianos são substâncias químicas, naturais ou sintéticas que têm a capacidade de impedir a multiplicação de bactérias ou de as destruir. Na década de 1940, a introdução destes para o tratamento de doenças infecciosas revolucionou a medicina. A sua descoberta foi um grande avanço a nível terapêutico, tanto na medicina humana quanto na veterinária, sendo muito importante na redução da morbidade e mortalidade de doenças infecciosas, como a tuberculose, a sífilis, a lepra e infecções pulmonares (FORSYTHE, 2002).

A resistência aos antimicrobianos aumentou significativamente nos últimos anos. Este panorama constitui um grave problema de saúde pública e de segurança alimentar em escala mundial, que se traduz num aumento da morbidade e da mortalidade das doenças infecciosas e que terá como consequência a diminuição da qualidade de vida e o aumento dos custos com saúde e cuidados médicos. Em cada ano, apenas na União Europeia, mais de 25.000 pessoas morrem de infeções causadas por bactérias resistentes a antimicrobianos (EFSA e ECDC, 2011; EFSA e ECDC, 2012).

Como exemplos de bactérias associadas a infeções alimentares resistentes aos antimicrobianos podem-se referir sorotipos de *Salmonella* Typhimurium, *Campylobacter* sp., *Shigella* sp., *Vibrio* sp., *Staphylococcus aureus*, *E. coli* (EFSA, 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras

Trinta amostras de filé de tilápia foram obtidas nos principais supermercados e feiras que comercializam esta espécie, localizados na cidade de São Luís – MA. Cada amostra foi representada por 500g, sendo 20 de supermercados e 10 de feiras, as quais foram acondicionadas em embalagens estéreis e transportadas em caixas isotérmicas até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA.

4.2. Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas realizadas foram a contagem de coliformes a 35°C e a 45°C, Número Mais Provável (NMP) e pesquisa de *E. coli*, segundo normas preconizadas pela Instrução Normativa nº62 de 2003 (BRASIL, 2003), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Preparo e Diluição das Amostras

No laboratório, as amostras de filés de tilápia foram retiradas de suas embalagens. Com auxílio de pinças e tesouras previamente esterilizadas, foram pesados 25g de cada amostra, asépticamente, para análise, adicionando-se a um frasco contendo 225mL de água peptonada (diluição 10^{-1}). A partir desta diluição, foram realizadas as diluições 10^{-2} e 10^{-3} , retirando-se uma alíquota de 1ml e adicionando-se a 9mL de água peptonada, para obtenção da diluição 10^{-2} e assim sucessivamente até a diluição 10^{-3} .

Determinação do Número Mais Provável (NMP/g) de coliformes a 35 °C e 45 °C

A partir das diluições decimais, foi inoculado 1ml de cada amostra em três séries de tubos de ensaio contendo Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) contendo tubos de Durham invertidos. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas. Foram considerados como positivos na prova presuntiva aqueles tubos com turvação e produção de gás. Para confirmação dos testes de coliformes a 35°C, alíquotas das culturas positivas do Caldo LST foram transferidas para tubos contendo Caldo lactose verde-brilhante bile a 2 % (VB). Os tubos foram incubados em estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, sendo considerados positivos aqueles que apresentaram turvação e formação de gás. Para

confirmação dos testes de coliformes a 45°C, alíquotas das culturas positivas foram transferidas para tubos contendo Caldo *Escherichia coli* (EC) e incubados em banho-maria a 45°C ± 2°C por 48 horas. Os resultados com produção de gás e turvação foram considerados positivos para coliformes a 45°C. Em seguida, foi determinado o número mais provável por grama de alimento (NMP/g), conforme tabela de Hoskins (BRASIL, 2003).

Pesquisa de Escherichia coli

Para a pesquisa de *Escherichia coli* nas amostras de filés de tilápia, foram semeadas alíquotas de cada tubo positivo no caldo EC, em placas contendo Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) e foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. Após este período, foram selecionadas três colônias sugestivas (azul escura com brilho metálico) e transferidas para tubos de TSA inclinado, incubadas em estufa a 35°C por 24 horas. Em seguida, foram realizados esfregaços corados pelo método de Gram, para a verificação de sua morfologia. Após a constatação da presença de bacilos Gram-negativos, estes foram submetidos à confirmação bioquímica, onde foram realizados os testes: produção de indol (I), Vermelho de metila (MV), Voges-Proskauer (VP) e citrato (C), segundo a técnica descrita por (VANDERZANT e SPLITTSTOESSER, 1992).

Os testes designados por IMViC (Indol, vermelho de metila, Vogues-Proskauer e Citrato) constituem uma bateria de quatro testes bioquímicos fundamentais para diferenciar enterobactérias.

Teste de produção de indol

Este teste permite qualificar as bactérias segundo a sua capacidade de utilizar o aminoácido triptofano como fonte de carbono e/ou energia. Algumas enterobactérias possuem uma enzima chamada triptofanase que catalisa a remoção do grupo indólico do triptofano. Assim, enquanto o indol acumula no meio de cultura, como desperdício, o restante da molécula de triptofano é transformada em piruvato e usada para satisfazer as necessidades nutricionais da bactéria. A produção de indol, a partir de triptofano, pode ser detectada cultivando-se micro-organismos num meio rico em aminoácido. A triptona (digerido pancreático de caseína) é constituída por inúmeros polipeptídeos que contêm muitos resíduos de triptofano. A acumulação de indol no meio pode ser detectada adicionando posteriormente o reagente de Kovac, que, reagindo com o indol, forma na superfície do meio um composto vermelho, não solúvel em água (SILVA et al., 2007).

Então, com o auxílio de uma alça estéril, foi inoculado cada uma das bactérias em meio triptona 1,5%; incubando as culturas a 35°C, durante 24 horas; adicionando-se 0,5 ml de reagente de Kovac ao meio de cultura, agitando suavemente. Resultados positivos (presença de indol) apresentaram composto vermelho/violeta, resultados negativos (ausência de indol), o reagente Kovac não altera sua cor.

Teste Vermelho de Metila

Este teste é usado para detectar as enterobactérias que utilizam a fermentação para produção de ácidos mistos. Como referido anteriormente, algumas enterobactérias fermentam glicose (ou outros hidratos de carbono) produzindo grandes quantidades de ácidos, que baixam o pH do meio de cultivo para menos que 5. A adição do indicador vermelho de metila permite detectar esse abaixamento do pH. O vermelho de metila é vermelho quando o pH é inferior a 5,5 e apresenta cor amarela se o pH for superior a 6. Bactérias produtoras de ácidos mistos podem então ser detectadas se forem cultivadas num meio pouco tamponado com glicose e, depois de um conveniente período de incubação, se adicionar vermelho de metila ao meio de cultivo (SILVA et al., 2007).

Com o auxílio de uma alça estéril, foi inoculado cada uma das enterobactérias em meio MR-VP (Metyl Red - Voges Proskauer); incubando as culturas a 35°C, por 24 horas; retirando-se 1mL da cultura para um tubo de ensaio; adicionando-se, ao restante da cultura, 5 gotas da solução de vermelho de metila; agitar suavemente.

Nesse 1ml retirado da cultura para um tubo de ensaio, realizou-se o teste de Voges-Proskauer. As amostras com cor vermelha foram consideradas positivas, amostras com cor amarela ou alaranjado foram consideradas negativas.

Teste de Voges-Proskauer

Este teste permite identificar as enterobactérias que produzem como produto da fermentação, o butanodiol. Neste caso, o principal produto acumulado é o 2,3 butanodiol. O teste, no entanto, detecta a presença de acetoína (intermediário metabólico da síntese de butanodiol) no meio de cultivo. A acetoína (acetilmetilcarbinol), na presença de KOH 40%, forma uma solução de cor rosa. A adição de α -naftol 5% acelera esta reação. Uma vez que, em presença de oxigênio, 2,3 butanodiol é retro-oxidado a acetoína, a intensidade da reação é aumentada pelo arejamento da solução (SILVA et al., 2007).

Foi adicionado a cada um dos tubos com 1 ml (retirados anteriormente) 0,6mL de α -naftol a 5% em etanol absoluto; sendo agitado cuidadosamente; adicionando-se 0,2mL de solução aquosa de KOH a 40%; agitando cuidadosamente de forma a arejar a cultura; incubando os tubos por um período de 15 a 60 minutos. Os tubos foram incubados inclinados para aumentar a superfície do meio exposta ao ar (a reação é dependente de oxigênio).

Resultado positivo desenvolveu-se uma cor vermelha na superfície da cultura; os negativos a cultura mantém uma cor homogênea castanha.

Teste de Citrato

Este teste permite determinar a capacidade das enterobactérias em utilizar citrato como fonte de carbono e energia, quando são cultivadas em condições aeróbias. O meio Citrato de Simmons contém citrato como única fonte de carbono e amônia como fonte de nitrogênio. Ao utilizar o citrato, o micro-organismo remove o citrato do meio levando à acumulação de sódio e ao aumento do pH, basificando o meio de cultivo. Este fato pode ser facilmente visualizado pela viragem de cor do indicador (azul de bromotimol) presente no meio de cultivo (SILVA et al., 2007).

Com o auxílio de uma alça estéril, foi inoculado cada uma das enterobactérias em meio Ágar de Simmons; incubadas a 35°C, durante 24 horas. Tendo como resultado positivo meios de cultura que apresentaram cor azul e negativo meios de cultura que apresentaram cor verde (cor inicial).

4.3. Susceptibilidade *in vitro* de isolados de *E. coli* frente aos antimicrobianos

Para a realização dos testes de susceptibilidade *in vitro* a antimicrobianos, pelo método de difusão de discos em placas contendo meio ágar Mueller-Hinton, foram utilizados discos dos seguintes antimicrobianos: ampicilina (10 μ g), cefuroxima (30 μ g), piperacilina + tazobactam(100/10 μ g), cefotaxima (30 μ g), gentamicina (10 μ g), levofloxacina (5 μ g), cefepime (30 μ g), sulfazotrim (23,75/1,25 μ g), ácido clavulânico+ amoxicilina (30 μ g), ceftioxitina (30 μ g) e amicacina (30 μ g). A interpretação dos resultados foi realizada com a leitura dos halos de inibição (CLSI, 2005).

4.4. Análise Estatística

Foram realizados testes de comparação de médias. Os dados foram submetidos a uma análise de variância ANOVA e classificação de médias e foram tratados pelo teste de Scott-Knott, no programa ASSISTAT Versão 7.7 beta (2014), ao nível de 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado na presente pesquisa que das 10 amostras de feiras analisadas, todas (100%) foram positivas para coliformes a 35°C e 45°C, com média de $1,014 \times 10^3$ para coliformes a 35°C e $7,32 \times 10^2$ para coliformes a 45°C. Já nos mercados foi verificado que das 20 amostras analisadas 18 (90%) foram positivas para coliformes a 35°C com média de $0,176 \times 10^3$ e 5 (25%) para coliformes a 45°C com média de $0,024 \times 10^2$.

Analisando a tabela 1, podemos verificar que nas feiras os produtos apresentaram maior contaminação tanto para coliformes a 35°C quanto para coliformes a 45°C em relação aos oriundos de mercados, com diferenças estatisticamente significativas. Isso se deve, provavelmente, à falta de refrigeração nos pontos de comercialização, à deficiência de higiene dos manipuladores ou pescadores, ausência de superfícies adequadas usadas na manipulação e armazenamento, tais como mesas e bancadas, caixas plásticas de armazenagem sujas e deterioradas. Essas condições podem, provavelmente, estar associadas aos elevados níveis de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C encontrados nos peixes.

Tabela 1: Determinação de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e presença de *E. coli* em amostras de filés de tilápia em trinta locais de coleta (feiras e mercados) de São Luís - MA, 2016.

Local da Coleta	Número de amostras	Média de NMP ¹ /g coliformes a 35°C	Média de NMP/g coliformes a 45°C
Feiras	10	$1,014 \times 10^3$ ^a	$7,32 \times 10^2$ ^c
Supermercados	20	$0,176 \times 10^3$ ^b	$0,024 \times 10^2$ ^d

Coefficiente de Variação de coliformes a 35°C (CV) = 70,07

Coefficiente de Variação de coliformes a 45°C (CV) = 115,1

¹ NMP: Número Mais Provável

^{a, b, c, d} Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa.

Esta mesma faixa de contagem de coliformes totais 10^2 a 10^3 também foi obtida por Vieira et al., (2000), através do sistema Simplate (método automatizado e mais sensível) com amostras de filé de tilápia coletadas em três pontos: no local da filetagem, congelamento no frigorífico e congelados nos postos de venda.

Verificando os resultados de feiras, os valores de coliformes totais encontrados no presente trabalho variaram de 240 a >1100 NMP/g. Pesquisa realizada por Abadias et al. (2008), ao estudarem pescado comercializado na grande São Paulo, verificaram resultados

semelhantes aos obtidos neste trabalho que variaram de 240 a >1100 NMP/g. Já Agnese et al. (2001) obtiveram valores superiores variando de 4 a 2400 NMP/g. Em contrapartida, constatou-se a ausência de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C em todas as amostras analisadas por FILHO et al. (2003).

Os valores de coliformes a 45°C em feiras variaram de 3,6 a >1100 NMP/g. Resultado semelhante em estudos realizados por Vieira et al. (2000), verificaram um aumento de 3,0 até $4,3 \times 10^3$ NMP/g coliformes termotolerantes ao longo da cadeia produtiva do pescado onde observaram precárias condições higiênicas e sanitárias na manipulação. Mas outros autores verificaram resultados diferentes como, por exemplo, Almeida et al. (2002), não obtiveram confirmação para coliformes termotolerantes em pintados (*Pseudoplatystoma fasciatum*) comercializados em supermercados. Liberato e Lopes-Shikita (2005) estudando coliformes totais em filé de tilápia encontraram valor inferior a 15 NMP/g de peixe e nenhuma apresentou confirmação para coliformes a 45°C e, conseqüentemente para *Escherichia coli*.

Verificando os resultados de supermercados, observou-se que, os valores de coliformes totais variaram de 3,6 a >1100 NMP/g. E 3,6 a 20 NMP/g para coliformes termotolerantes. No qual em todas as amostras (100%) foram detectados coliformes. Resultados satisfatórios foram também descritos por Hoffman et al. (1999) em amostras de peixes comercializado em São José do Rio Preto – SP, que não detectaram a presença de coliformes a 45°C em 100% das amostras analisadas.

Lira et al. (2001), ao estudarem peixe serra (*Pristis pectinata*) comercializado em Maceió, AL, encontraram desde < 3 até 43 NMP/g de coliformes a 45°C. Rall et al. (2008), ao analisarem peixe fresco comercializado na cidade de Botucatu, SP, verificaram variações de < 3 a 93 NMP/g de coliformes a 45°C. Tavares et al. (2008) observaram uma variação de < -3 a 3,6 NMP/g de coliformes a 45°C em tilápias cultivadas em sistemas de reuso de efluentes domésticos. Todos os resultados citados, anteriormente, corroboram com os achados do presente trabalho.

As baixas contagens de coliformes totais e termotolerantes reportadas nos supermercados, provavelmente, estão relacionadas a melhores condições higiênico sanitárias. Além disso, a baixa ocorrência de coliformes, provavelmente está associada à adoção de boas práticas de manipulação e conservação (SOCCOL et al., 2002).

Nos supermercados, os manipuladores estavam uniformizados, com aventais limpos, gorro, máscara, botas, etc. Além de o pescado ser mantido em melhores condições de

conservação (Figura 1), manipulação, dentre outros, o que pode ter influenciado na redução de contaminação.



Figura 1. Peixes expostos à venda em supermercado: melhores condições de refrigeração.

Para Vieira et al. (2004), as condições higiênicas de equipamentos que entram em contato com o pescado determinam a qualidade do produto, por serem esses alimentos altamente perecíveis. Neste estudo, foi observado inadequado padrão de higiene, onde observou-se ausência do uso de equipamentos de proteção individual por parte dos manipuladores, e ainda equipamentos e utensílios que entram em contato com os peixes que são de materiais que transmitem substâncias tóxicas, odores, sabores aos mesmos, foram encontradas facas com cabo de madeira e tábuas de evisceração também em madeira, além de não serem mantidos em bom estado de conservação, figura 2.



Figura 2. Peixes expostos à venda em feira: bancada de azulejos, sem refrigeração.

Freire et al. (2011), relatam que a exposição do pescado à venda na feira livre é mais precária do que em supermercados, pois os peixes ficam expostos ao sol, ao constante trânsito de animais e ao lixo exposto em local inadequado.

Um item preocupante neste estudo foi a falta de treinamento de manipuladores, pois segundo a Portaria n° 326 (BRASIL, 1997) “todo o manipulador em contato com o alimento deve receber instruções adequadas e contínuas sobre requisitos higiênico-sanitários, manipulação e higiene pessoal e ter conhecimento de boas práticas de fabricação.

Recomenda-se a intensificação das ações de vigilância sanitária nesses locais para impor práticas de higiene e implantação do uso de equipamentos ou gelo para manutenção de baixas temperaturas na conservação do pescado, melhorar condições de infraestrutura nas feiras livres especialmente em termos sanitários e de fornecimento de água, pois flagrantes irregularidades foram observadas em todos esses locais, apresentando não conformidades com base na Resolução-RDC n°216/04 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2004).

Pesquisa de *E. coli*

Oito amostras, foram submetidas à pesquisa de *E.coli* e foram observadas colônias sugestivas de *E .coli* na coloração verde metálico-(Figura 3).

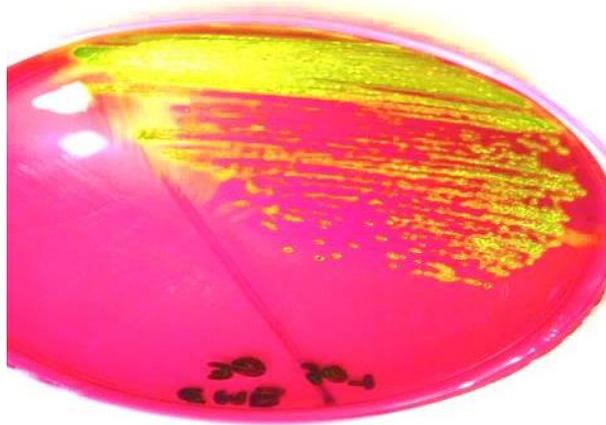


Figura 3. Placa com colônia sugestiva de *E. coli* na coloração verde metálico.

Através do método de Gram, foi constatada a presença de bacilos Gram-negativos (Figura 4).

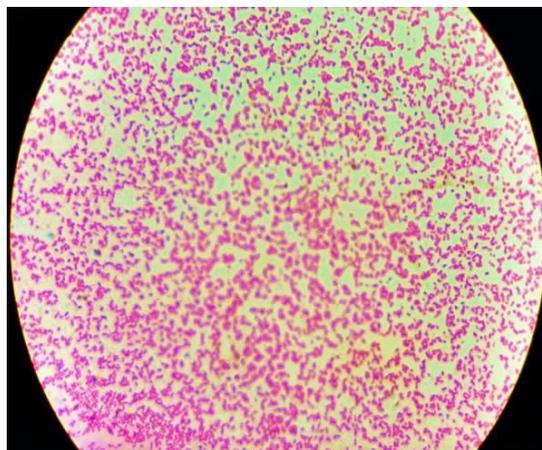


Figura 4. Lâmina corada pela coloração de Gram (1000x) contendo bacilos Gram-negativos.

Após serem submetidas aos testes bioquímicos para confirmação de *E.coli*, somente sete foram identificadas como *E.coli*. Na figura 5, observa-se o resultado de uma das amostras submetidas aos testes bioquímicos (IMViC).

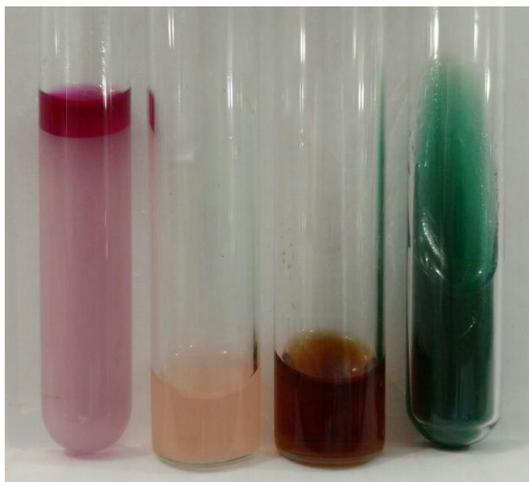


Figura 5. Resultado de uma amostra no teste IMViC, confirmando *E. coli*.

Todas as cepas confirmadas foram isoladas do pescado oriundo de feiras, evidenciando as condições higiênico-sanitárias insatisfatórias do ambiente. Em contrapartida, Barreto et al. (2012), ao realizarem a avaliação das condições higiênico-sanitárias do pescado comercializado no município de Cruz das Almas, Bahia relataram que as amostras do supermercado, apresentaram coliformes a 45°C variando de $1,1 \times 10^2 > 1,1 \times 10^3$ com a presença de *E.coli* em 100 % das amostras, demonstrando que os supermercados não são os melhores locais para a aquisição de peixe.

A presença desta bactéria em alimentos indica uma possível contaminação fecal com possível presença de outros patógenos. A contagem elevada dessa bactéria em alimentos geralmente indica falta de higiene na manipulação, nas operações de produção, armazenamento inadequado e de contaminação pós-processamento (GONZÁLEZ et al., 2003).

Em onze amostras de pescado provenientes de São José do Rio Preto – São Paulo, Hoffman et al. (1999) verificaram a presença de nove amostras em desacordo com a legislação e também foram confirmadas duas amostras com a presença de *E.coli*. Silva et al. (2002) avaliando a qualidade de amostras de pescado comercializado em Maceió, Alagoas verificaram a presença de *E.coli* em 15% de amostras e 55% com coliformes termotolerantes acima dos padrões legais. Agnese et al. (2001) avaliaram as condições higiênico-sanitárias de 26 amostras de pescado fresco comercializado num município do Rio de Janeiro, e observaram que todas as amostras estavam de acordo com o preconizado pela legislação vigente para coliformes termotolerantes, e isolaram *E.coli* em 34,6% das amostras.

A bactéria *E.coli* está entre os principais responsáveis por surtos de toxinfecções alimentares quando estes são associados às condições higiênico-sanitárias insatisfatórias dos manipuladores, como falha na higienização das mãos, indicando contaminação de origem fecal (OLIVEIRA et al., 2003). A exposição do pescado nos pontos de venda, exposto ao público sem nenhum tipo de embalagem ou proteção, também contribui para o aumento da carga microbiológica.

A detecção de microrganismos indicadores de contaminação fecal ou bactérias do grupo coliformes a 45°C, em especial *E. coli*, indicam que os peixes foram provavelmente capturados em ambientes com elevados índices de contaminação por resíduo fecal de esgoto. Outra hipótese cabível, é que o pescado tenha sido manipulado e/ou processado em condições higiênicas inadequadas que implicaram no grau de contaminação.

De forma geral, a ocorrência de *Escherichia coli* patogênica em ambientes aquícolas e produtos da pesca ainda possui pouca atenção. Porém a pesquisa por esse patógeno neste ambiente pode ser uma forma fácil para o controle de contaminantes e garantia da qualidade do produto final.

Susceptibilidade *in vitro* de *E. coli* a antimicrobianos

Pelo teste de sensibilidade a antimicrobianos, pode-se observar sensibilidade aos antimicrobianos testados (figura 6).

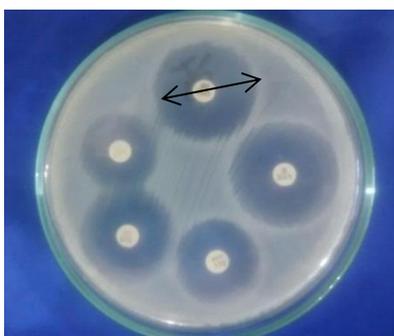


Figura 6. Cultura de *E.coli* inoculada em ágar Mueller Hinton adicionado de discos antimicrobianos. A seta indica o halo de inibição causado pelo antimicrobiano.

Os antimicrobianos testados representam classes de drogas importantes para a terapêutica na medicina humana e veterinária. Verificou-se que dos sete isolados de *E.coli*,

somente um foi resistente a ampicilina e os demais apresentaram sensibilidade aos onze antimicrobianos testados (tabela 2).

Tabela 2. Resultados dos testes de sensibilidade antimicrobiana

ANTIMICROBIANO	RESISTENTE	INTERMEDIÁRIO	SENSÍVEL
Cefuroxina	-	-	7
Ampicilina	1	1	5
Piperacilina + tazobactam	-	-	7
Cefotaxina	-	-	7
Gentamicina	-	-	7
Levofloxacina	-	-	7
Cefepima	-	-	7
Sulfazotrim	-	-	7
Ácido Clavulânico + amoxicilina	-	1	6
Cefoxitina	-	-	7
Amicacina	-	-	7

Os antimicrobianos, cefuroxima, piperacilina + tazobactam, cefotaxima, gentamicina, levofloxacina, cefepima, sulfazotrim, cefoxitina e amicacina se mostraram eficazes contra as cepas de *E.coli* isoladas de filés de tilápia. Do total de antimicrobianos, dois se mostraram com sensibilidade intermediária (ampicilina e ácido clavulânico + amoxicilina) e somente um antimicrobiano, a ampicilina apresentou resistência, em apenas uma das amostras.

Resultados semelhantes foram encontrados por Martinhago et al. (2008), ao avaliarem perfil de susceptibilidade de *E. coli* isoladas do Lago Municipal em Cascavel, PR; por Carneiro et al. (2007) no qual encontraram resistência para ampicilina em *E. coli* isoladas de peixes de viveiros; por Melo (2006) que relatou resistência a ampicilina de 20% em *E. coli* isoladas da Lagoa do Parque Estadual do Rio Doce, MG. Esses relatos demonstram que a presença de organismos antimicrobianos-resistentes ou genes-resistentes varia de acordo com alguns parâmetros como, por exemplo, proximidade com áreas que utilizam antimicrobianos, como áreas de cultivo ou esgotos hospitalares, águas poluídas com esgotos industriais, devido os metais contribuírem no aumento da resistência antimicrobiana ou, ainda, as diferentes estações do ano, sendo mais frequente o aumento da resistência no período chuvoso (PEAK et al., 2007).

A resistência observada às penicilinas era esperada devido à característica intrínseca que a bactéria *E.coli* apresenta para esses fármacos. Segundo Tavares (2009), os bacilos Gram-negativos entéricos tais como *E. coli* têm apresentado ampla resistência a antimicrobianos tradicionalmente ativos, tendo como exemplo, ampicilina e cefalosporinas. Além disso, a incidência de resistência relatada pode ser atribuída ao uso frequente de ampicilinas como antimicrobianos de primeira linha (SAYAH et al., 2005) nas últimas décadas.

As bactérias resistentes aos antimicrobianos e/ou os seus genes oriundos de animais de produção intensiva podem ser transmitidas ao homem não só através da cadeia alimentar, mas também através do ambiente (ex. água) ou por contato direto com os animais (EFSA e ECDS, 2012). Os animais para consumo humano como galinhas, suínos, são um reservatório de espécies bacterianas que causam infecções em humanos. Diferentemente dos peixes que sua infecção ocorre através de contaminação cruzada podendo transportar genes de resistência a antimicrobianos clinicamente relevantes (COLLINGTON et al, 2009).

Jeyasanta et al.(1997) quando avaliaram 92 isolados de *Escherichia coli* de frutos do mar comercializados na Costa de Tuticorin, Índia, encontraram 47% e 34% de resistência para amoxicilina e ampicilina, respectivamente. Em isolados de *Escherichia coli* de estuários da cidade de Cochim, Índia, Sukumaram et al. também observaram 65% de resistência para ampicilina entre os 75 isolados avaliados.

No Brasil, em uma pesquisa realizada por Rebello e Regua-Mangia (2014) sobre o potencial de virulência e a resistência antimicrobiana de cepas de *E.coli* isoladas de ambientes aquáticos no Rio de Janeiro, os autores relatam que, de um total de 178 cepas de *E.coli*, 37% apresentaram resistência antimicrobiana a, pelo menos um, de 11 antimicrobianos testados, sendo os maiores percentuais apresentados a cefalotina e a ampicilina.

As amostras de *E. coli* isoladas de alimentos estão em consonância com os achados de Jakobsen et al. (2010) onde isolados clínicos de *E. coli* apresentaram maior percentual de resistência para ampicilina.

Para White et al. (2006) o uso abusivo destas drogas está associado a diversos problemas, como a presença de resíduos ilegais na carne e transmissão de bactérias resistentes para o meio ambiente, animais e o próprio homem, num potencial risco à saúde pública.

O uso de antimicrobianos, na aquicultura, é realizado como medida de profilaxia, porém quando realizado de forma inadequada pode gerar bactérias resistentes através da pressão seletiva estabelecida no ambiente. Os antimicrobianos utilizados nesta pesquisa são

importantes para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram negativas na medicina humana e veterinária.

A presença de muitos isolados de *E. coli* resistentes no ambiente aquícola geram implicações ecológicas e de saúde pública, além de enfatizar a necessidade de novos estudos, principalmente em relação aos determinantes de resistência, assim como a possibilidade de transferência de genes de resistência a patógenos humanos mediante o consumo de pescado (MIRANDA e ZEMELAMAN, 2001). De acordo com Sapkota. (2008) o desenvolvimento de bactérias resistentes a antimicrobianos no ambiente aquícola pode contribuir ou influenciar a ocorrência dessa característica em bactérias presentes na população humana.

Além disso, o consumo de carnes cruas contaminadas induz a contaminação cruzada e a ingestão de bactérias resistentes a antimicrobianos. Assim, as opções de tratamento poderão ficar limitadas se estirpes de bactérias resistentes a antimicrobianos forem transferidas de alimentos contaminados aos seres humanos (HAMMERUM e HEUER, 2009).

Faz-se necessária a conscientização dos produtores e empresários desta atividade em relação à existência de contaminação de origem fecal, incluindo-se a presença de enteropatógenos, pois a manutenção desta forma de produção pode trazer prejuízos ao consumidor. A presença de isolados de *E. coli* nesse estudo indica contaminação por enteropatógenos advindos de excretas humanas e/ou animais, representando risco à saúde dos consumidores, principalmente aos mais susceptíveis como crianças, idosos e adultos imunodeprimidos.

Diante do exposto, pode-se observar que o consumo do pescado adequadamente preparado e cozido, a educação dos consumidores e produtores sobre os riscos de contaminação cruzada, a conscientização da população sobre o consumo inadequado de peixes crus e outras medidas no preparo podem reduzir alguns problemas de contaminação – infecção.

Do ponto de vista de saúde pública, torna-se importante e necessária uma campanha educacional dirigida aos produtores, para conscientização das boas práticas de manejo, principalmente relacionada à existência de outros animais próximos aos tanques de cultivo, às medidas profiláticas incorretas, à alimentação imprópria dos peixes e às condições de água utilizada dos tanques.

6. CONCLUSÃO

As feiras apresentaram maior contagem de coliformes a 35°C e a 45°C, quando comparadas aos supermercados, sendo esta diferença estatisticamente significativa.

Foram encontradas 7 cepas de *E. coli* em amostras provenientes de feiras e nenhuma em amostras provenientes de supermercados. Isso se deve provavelmente a condições higiênico-sanitárias mais precárias de instalações, equipamentos, utensílios e manipuladores em feiras do que em supermercados.

Uma cepa foi resistente ao antimicrobiano ampicilina e duas apresentaram resistência intermediária aos antimicrobianos ampicilina e ácido clavulânico + amoxicilina. Isso pode ser resultado da utilização de antimicrobianos na criação dos peixes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNESE A.P; OLIVEIRA V. M; SILVA P. P. O; OLIVEIRA G. A. Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e enumeração de coliformes totais e fecais em peixes frescos comercializados no município de Seropédica–RJ. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo. v.15, n.88, p. 67-70, set 2001.

ABADIAS, M; USALL, L; ANGUERA, M; SOLSONA, G; VINÃS, I; Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. **International Journal of Food Microbiology**. v. 123. P. 121-129. 2008.

ALMEIDA FILHO, E. S; SIGARINI, C. O; RIBEIRO, J. N; DELMONDES, E. C; STELATTO, E; ARAÚJO JÚNIOR, A. Características microbiológicas de “pintado” (*Pseudoplatystomafasciatum*) comercializado em supermercados e feira livre, no município de Cuiabá – MT. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 99, p. 8-84, 2002.

BEIRÃO, L. H; **Tecnologia pós-captura de pescado e derivados**. In: POLLI, Carlos Rpgério; et al. *Aquicultura: Experiências Brasileiras*. UESC. Rio Grande do Sul, 2004. 455p. 407 – 442.

BRASIL. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003**. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>. Acesso em: 24 Out 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº216 de 15 de setembro de 2004**. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. **Aprova Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Disponível em: <http://www6.ensp.fiocruz.br/visa/files/bol11.pdf>. Acesso em: 24 Out 2016.

BARRETO, N. S. E; MOURA, F. C. M; TEIXEIRA, J.A; ASSIM, D. A; MIRANDA, P. C. Avaliação das condições higiênicas do pescado comercializado no município de Cruz das Almas, Bahia. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.25, n.3, p. 86-95, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº368 de 10 de setembro de 1997. Aprova Regulamento Técnico sobre as condições Higiênicossanitária e Boas Práticas de Fabricação para estabelecimentos Elaboradores/ Industrializadores de alimentos. Brasília (DF), 1997 a.

CLSI – Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais. 2005. OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde / ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf. Acesso em: 02 Jun 2016.

CARDOSO, C. L. N.; ANDRÉ, B. P. D. C. M.; SERAFINI, B. A. Avaliação Microbiológica de Carne de Peixe Comercializada em Supermercados da Cidade de Goiânia, GO. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo.v.17, n. 109, v.17,p. 81-87, jun. 2003.

CONTRERAS-GUZMÁN, E. S. Bioquímica de pescado e derivados. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 409 p.

COLLINGTON, P. et al (2009). World Health Organization Ranking of Antimicrobials According to their Importance in Human Medicine: A critical step for developing risk management strategies for the use of Antimicrobials in food production animals. *Doenças Infecciosas Clínicas*, 49 (1), pp. 132-141.

CRAWFORD, A. M. C. D. Seleção e preparo de alimentos. Rio de Janeiro: Record, 1985. 383 p.

CAMPOS, D. S; PAIVA, Z. C. **Condição Higiênico-Sanitária do Pescado Comercializado em Feira no Município de Manaus – AM**. 2012. Disponível em: <http://www.fazu.br/ojs/index.php/posfazu/article/viewFile/405/297>. Acesso em: 25 Out 2016.

DAMS, R. I.; RIBEIRÃO, L. H.; TEXEIA, E. **Avaliação da Qualidade Microbiológica de Pescadinha (*Cynoscion striatus*) e em filé nos principais pontos críticos de controle de**

uma indústria de Pescado Congelado. Boletim. Centro Estadual de Pesquisa Alimentícia, v.14, p.151-162,dez.1996).

European Food Safety Authority (2011). **Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals.** EFSA Journal, 9(8), pp. 1-95.

European Food Safety Authority e European Centre for Disease Prevention and Control (2012). **The European Union Summary Report antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010.** EFSA Journal, 10(3), pp. 1-233.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of world fisheries and aquaculture.** World Food and Agriculture. Roma: FAO; 2012. 230p.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistical Yearbook. World Food and Agriculture.** Roma: FAO; 2013a. 307p.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Garantia da qualidade dos produtos da pesca. **Fisheries and Aquaculture Department.** Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/003/t1768p/T1768P03.htm>. Acesso em 08 Nov 2016.

FREIRE, J. L; SILVA, B. B. SOUZA, A. S. Aspectos Econômicos e Higiênicos-Sanitários da Comercialização do pescado no Município de Bragança (PA). **Biota Amazônica.** Macapá, v.1, n. 2, p.17-28, 2011.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar.** Brasil, Artmed. 2002.

FILHO, V. E. M. Avaliação da qualidade microbiológica e bromatológica de Pirarucu (*Arapaima gigas*) salgado-seco, comercializado nas feiras livres da cidade de Manaus – AM. **Revista Higiene Alimentar,** São Paulo. v.17, n.111, p. 66-72, ago 2003.

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

GONÇALVEZ, A. A. SOARES, K. M. P. Qualidade e Segurança do Pescado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, 2012; 71 (1):1-10. v. 71, n.1, p.1-10, 2012.

GEUS, J. A. M.; LIMA, I. A. **Análise de Coliformes totais e fecais: Um Comparativo entre técnicas oficiais VRBA e Petrifilm EC aplicados em uma indústria de carnes**. In: Encontro de Engenharia e Tecnologia dos Campos Gerais, 2, 2008.

GOZLAN, R. E, BRITTON, J. R, COWX, I. COPP, G. H. Conhecimento atual sobre introduções de peixes de água doce não-naturais. *J Fish Biology*. 2002;76(4):751–86.

GUIMARÃES, A.G.; LEITE, C.C.; TEXEIRA, L.D.D.; SANTANA, M.E.B.; ASSIS, P.N. Detecção de *Salmonella spp* em pacientes e manipuladores envolvidos em um surto de infecção alimentar. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador. v.2,n.12,p.1-4, jan.2001.

GONÇALVES, A.; HERNANDES, C.P. Defumação líquida de anchova (*Pomatus saltatrix*) efeito do processamento nas propriedades químicas e microbiológicas. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo. v.18, n.4,p.438-443,nov.1998.

GONZÁLEZ, S; FLICK, G. J; O'KEEFE, S. F; DUNCAN, S. E; McLEAN, E; CRAIG, S. R. Composition of farmed and wild yellow perch (*Perca flavescens*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n.6-7, p. 720-726, 2003.

HAMMERUM, A. M.; HEUER, O. E. **Human health hazards from antimicrobial resistant Escherichia coli of animal origin**. *Doenças Infecciosas Clínicas*, v.48, n.7, p.916-921, 2009.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Dados pesqueiros. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=&codmun=211130&idtema=159&search=maranhao/sao-luis/pecuaria-2015>. Acesso em: 1 de Dez.

JAY MJ. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

JAKABI, M.; BUZZO, A. A.; RISTORI, C. A.; TAVECHIO, A. T.; SAKUMA, H.; PAULA, A. M. R.; GELLI, D. S. Observações Laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* ocorridos na grande São Paulo no período de 1994 a 1997, **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo.v.58,n. 1,p.47 – 51,fev.1999.

JAKOBSEN, L. *Escherichia coli* isolates from broiler chicken meat, broiler chickens, pork, and pigs share phylogroups and antimicrobial resistance with community-dwelling humans and patients with urinary tract infection. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 05, p. 537-547, 2010.

JEYSANTA, K. I; AIYAMPERUMAL, V; PATTERSON, J. 2012 Prevalence of antibiotic resistant *Escherichia coli* min sea foods of Tuticorin Coast, Southeastern India. **Advances in Biological Research**, 6(2): 70-77, 2012.

LIRA, G. M.; PEREIRA, W. D.; ATHAYDE, A. H.; PINTO, K. P. Avaliação da qualidade de peixes comercializados na cidade de Maceió, AL. *Higiene Alimentar*, v.15, n.84, p.67-74, 2001.

LOPES, E.; BERTOLINO, M. T.; GODOY, R.; ZURITA, T.; GODEGUEZ, V. **Sistemas de Controle da Qualidade**. In: I SIMCOPE (Simpósio de Controle de Pescado), 17 e 18 mar. 2005, São Vicente, Anais... Disponível em: ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/simposio_controle_pescado.pdf. Acesso em: 25 Out 2016.

MARTINHAGO, M. W.; BUZANELLO, E. B.; ALMEIDA, M. M.; PINTO, F. G. S. Avaliação do perfil de sensibilidade das cepas de *Escherichia coli* isoladas da água do lago municipal de Cascavel, Paraná. **Revista Brasileira de Biociência**, v.6, p.62-62, 2008.

MELO, S. K. **Caracterização de fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* de lagoas do Parque Estadual do Rio Doce – MG**. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Curso de Engenharia Ambiental da Escola de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2006.

MIRANDA, C. D.; ZEMELMAN, R. Antibiotic resistant bactéria in fish from the Concepción Bay, Chile. *Marine Pollution Bulletin*, v.42, n.11, p.1096-1102, 2001.

MOURA, A.F.P.; MAYER B.D.M.; LANDGRAF, M.; TENUFA, F.A. Qualidade química e microbiológica de camarão rosa comercializado em São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo. v.3, n.39,p.23-28, abril/jun.2003.

MORETTO, E; FETT , R; GONZAGA, L. V; KUSKOSKI, E. M. **Introdução à ciência de alimentos**. Florianópolis: UFSC, 2002. 255 p.

OGAWA, M.; E MAIA, E. L. **Manual da Pesca Ciência e tecnologia do pescado**. São Paulo: 1999, Varela, v. 1, p. 253 – 259.

OETTERER, M. Proteínas do pescado: processamento com intervenção na fração proteica. In: OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006. p. 99-134.

OETTERER, M. Agroindústrias beneficiadoras de pescado cultivado: unidades modulares e polivalentes para implantação, com enfoque nos pontos críticos, higiênicos e nutricionais. Piracicaba, 1999. 196 f. (livre – Docência). **Escola Superior de Agricultura “ Luis de Queiroz” Universidade de São Paulo**, São Paulo, 1999.

OLIVEIRA, G. E.; SANTOS, S. J. F.; PEREIRA, L. M. A.; LIMA, B. C. Circular Técnica. **Produção de tilápia: Mercado, espécie, biologia e recria**. Ministério da Agricultura, Pesca e Abastecimento. 2007.

PEAK, N.; KNAPP, C. W.; YANG, R. K.; HANFELT, M. M.; SMTH, M. S.; AGA, D. S.; GRAHAN, D. W. **Abundance of six tetracycline resistance genes in waterwater lagoons of cattle feedlots with different antibiotic use strategies**. Environmental microbiology, v.9, p.143-151, 2007.

PIEDADE, K. R. **Uso de ervas aromáticas na estabilidade oxidativa de filés de sardinha (Sardinella brasiliensis) processados**. Piracicaba, 2007. 160 f. Dissertação (Mestrado em

Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PINTO, P. S. A. Aspectos Sanitários da salmonelose como uma Zoonose. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo. v . 14,n. 73,p.39 – 43, mai.2001.

PARANÁ (Estado). **Secretaria da Saúde. Instituto de Saúde**. Centro de Saneamento e Vigilância Sanitária. Manual Educativo para a Proteção dos Alimentos. Paraná, 1993.

RALL, V. L. M.; CARDOSO, K. F. G.; XAVIER, C. **Enumeração de coliformes termotolerantes em pescados frescos e congelados**. Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia, Londrina, v.2, n.39, p.1-8, 2008.

REBELLO, R. C. L e REGUA-MANGIA, A. H . Potencial enterovirulence and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from aquatic environments in Rio de Janeiro, Brazil. **Science of the Total Environment**, 490: 19-27, 2014.

ROCHA, C. M. C. da; RESENDE, E. K. de; ROUTLEDGE, E. A. B.; LUNDSTEDT, L. M. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. **Pesq. Agropec. Bras., Brasília**, v.48, n.8, ago, 2013.

RUITER, A. **Fish and fishery products: composition, nutritive properties and stability**. Wallingford: CAB International, 1995. 387 p.

SAKPOTA, A.; SAPKOTA, A. R.; KUCHARSKI, M.; BURKE, J.; MCKENZIE, S.; WALKER, P.; LAWRENCE, R. Aquaculture practices and potencial human health risks: Current knowledge and future priorities. **Environment International**, v.34, n.8, p.1215-1226, 2008.

SILVA, M. C.; NORMANDE, L. C. A.; FERREIRA, V. M.; RAMALHO, S. L. Avaliação da qualidade microbiológica do pescado comercializado na cidade de Maceió, AL. **Revista de Higiene Alimentar**, São Paulo,v.6,n. 96,p.60-64, nov. 2002.

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Aquicultura no Brasil. Série estudos mercadológicos.** 2015. Disponível em: [http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/\\$File/5403.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/$File/5403.pdf). Acesso em: 18 Out 2016.

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **1º Anuário Brasileiro de Pesca e Aquicultura. Potencial Brasileiro.** 2014. Disponível em: http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/16061/2489520_218117.pdf. Acesso em: 18 Out 2016.

SGABIERRI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos:** propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Varela, 1996. 517 p.

SOCOL, M. C. H. **Effects of modified atmosphere And vacumm on the shel-life of tilapia. Brazilian Journal of Food Technology** (impresso), v.8, n.1, p.7-15, 2002.

OLIVEIRA, G. E.; SANTOS, S. J. F.; PEREIRA, L. M. A.; LIMA, B. C. Circular Técnica. **Produção de tilápia: Mercado, espécie, biologia e recria.** Ministério da Agricultura, Pesca e Abastecimento. 2007.

SAYAH, R. S; KANEENE, J. K; JOHNSON, Y; MILLER, R. 2005 Patterns of antimicrobial resistance observed in Escherichia coli isolates obtained from domestic – and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Applied and Environmental Microbiology*. v.71, n.3, p.1394-1404, 2005.

SILVA, M. C.; NORMANDE, L.C.A.; FERREIRA, V.M.; RAMALHO, S.L. Avaliação da qualidade microbiológica do pescado comercializado na cidade de Maceió, AL. **Revista de Higiene Alimentar**, São Paulo, v.6, n. 96, p.60-64, nov. 2002.

TAVARES, W. Antibióticos e quimioterápicos para o clínico. **Segunda edição São Paulo: Atheneu.** 599p, 2009.

TAVARES, W. 2009 Antibióticos e quimioterápicos para o clínico. 2° ed. São Paulo: Atheneu.

TAVARES, F. A.; LAPOLLI, F. R.; BATISTA, C. R. V.; MAIA, I. S.; JUNGLES, M. K. Reuso de efluentes domésticos na produção de tilápias – aspectos sanitários. In: CONGRESSO INTERAMERICANO AIDIS, 21., 2008, Santiago, Chile. Anais. Santiago: 2008. p.1-6.

VANDERZANT, C; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of Methods for the microbiological. Examination of food, American Public Health Association, 1992.**

VIEIRA, R. H. S. F. Influência das condições higiênico-sanitárias no processo de beneficiamento de tilápias (*Oreochomis niloticus*) em filés congelados. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.74, p. 37-40, 2000.

VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado**. São Paulo: Varela, 2004.

WHITE, D. G.; FEDORKA-CRAY, P.; CHILLER, T. C. The National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS). **NMC Annual Meeting Proceedings**. P.56-60, 2006.