



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

FABIANA BORRALHO FRAZÃO

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE
ANTIMICROBIANA DAS BACTÉRIAS ISOLADAS DA PESCADA AMARELA
(*Cynoscion acoupa*) COMERCIALIZADA NA CIDADE DE SÃO LUÍS-MA**

SÃO LUÍS

2018

FABIANA BORRALHO FRAZÃO

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE
ANTIMICROBIANA DAS BACTÉRIAS ISOLADAS DA PESCADA AMARELA
(*Cynoscion acoupa*) COMERCIALIZADA NA CIDADE DE SÃO LUÍS-MA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Francisca Neide Costa.

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Isabel Azevedo Carvalho

**SÃO LUÍS
2018**

Frazão, Fabiana Borralho.

Qualidade microbiológica e perfil de suscetibilidade antimicrobiana das bactérias isoladas da pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializada na cidade de São Luís - MA/ Fabiana Borralho Frazão. – São Luís, 2018.

60 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2018.

Orientador: Profa. Dra. Francisca Neide Costa.

FABIANA BORRALHO FRAZÃO

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE
ANTIMICROBIANA DAS BACTÉRIAS ISOLADAS DA PESCADA AMARELA
(*Cynoscion acoupa*) COMERCIALIZADA NA CIDADE DE SÃO LUÍS-MA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva.

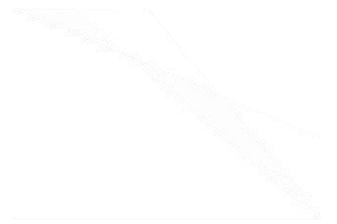
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em: ____/____/____ pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Francisca Neide Costa
(Orientadora)

Prof.^a Dr.^a Rejeana Márcia Lima Silva
(1º membro)

Prof.^a Dr.^a Nancyleni Pinto Chaves Bezerra
(2º membro)



Dedico a todos que gostam de peixe!!!

Ao meu pai (pescador) que sente orgulho da minha profissão de Engenheira de

Pesca, dedico.

Aos pescadores do povoado de Ilha Grande, município de Humberto de Campos – MA,

dedico.

AGRADECIMENTO

A Deus, sou grata pela vitória concedida.

Aos meus pais, Srº Frazão e Antônia Borralho, que são meus referenciais de vida, e que principalmente foram meu estímulo, não só para chegar até aqui, mas ir além, profissionalmente.

Aos familiares, pastores e irmãos em Cristo Jesus pelo apoio financeiro, oração, torcidas pelo meu rompimento em toda área e carreira profissional.

Ao meu engenheiro favorito e namorado Ricardo Henrique, pelas parcerias, incentivos de melhorias e apoio no decorrer da elaboração da dissertação; ele que tem alegrado minha vida sempre.

Aos meus amigos do mestrado em Ciência Animal que me chamam com carinho de “Presidenta”, eu a eles de Nayarix, Dennix, Jayannix, Karolxix, Estersix, Alanix, Ionix, Samirix, Higor, PV, Cris Thosan e Garoto Jurará. E não poderia esquecer de minha Engenheira de Pesca predileta e amiga de muitos anos, Lyssandra Kelly (Lyssandrex). Muito obrigada.

À Prof.^a Dr.^a Francisca Neide Costa pela orientação, credibilidade e oportunidade cedida.

À Prof.^a Dr.^a Isabel Azevedo Carvalho pelo auxílio, contribuições e amizade (“Profix”).

Aos estagiários/bolsistas de Iniciação Científica do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água que se disponibilizaram e me ajudaram em situações ímpares.

À D. Ruth e Thaliane França, pela amizade, presença e orientações no laboratório.

À coordenadora Alana Lislea e aos professores do Mestrado Ciência Animal pelo auxílio e ensinamentos.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo durante o período do mestrado.

À FAPEMA pela concessão do auxílio financeiro à pesquisa por meio do Edital Universal nº 40/2014.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu estivesse aqui, finalizando esta etapa e, então, poder proferir meus agradecimentos.

FRAZÃO, F. B. **Qualidade microbiológica e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das bactérias isoladas da pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializada na cidade de São Luís - MA.** 2018. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2018.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica e o perfil de suscetibilidade antimicrobiana das bactérias isoladas da pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializada na cidade de São Luís - MA. Foram obtidas 60 amostras de postas de pescada amarela de cinco supermercados e cinco feiras, no período de outubro de 2016 a fevereiro de 2017, as quais foram analisadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA. Para o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos foram analisados 53 isolados de *Aeromonas* spp. e quatro isolados de *Escherichia coli*. Os testes suscetibilidade *in vitro* aos antimicrobianos foram realizados por disco-difusão, de acordo com Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). A seleção dos onze antimicrobianos se deu com base aos mais utilizados na clínica humana e veterinária. Nas amostras de feiras foi observado a presença de coliformes a 35°C (93,33%), coliformes a 45°C (80%) e *E. coli* (13,33%). Nas amostras adquiridas dos supermercados, foi observada presença de coliformes a 35°C (86,67%), coliformes a 45°C (46,67%) e não foi detectada a presença de *E. coli*. Nenhuma amostra apresentou contaminação por *Staphylococcus* coagulase positivo, *Salmonella* spp., *Listeria* sp. e *V. parahaemolyticus*, para ambos os ambientes de comercialização. Foram isoladas quatro espécies do gênero *Aeromonas*, sendo que a mais frequente foi *A. hydrophila*, em 43 (81,13%) amostras. Foi verificada maior resistência de *E. coli* à levofloxacina e sulfa-trimetoprim; assim como houve resistência antimicrobiana dos isolados de *Aeromonas* spp. à ampicilina, amoxicilina-clavulanato, cefuroxima e cefotaxima. Os valores encontrados para o índice MAR, evidenciam multirresistência em 90,54% (n=48) dos isolados de *Aeromonas* spp. e em 50% (n=2) dos isolados de *E. coli*. Uma cepa de *Aeromonas* spp. apresentou resistência a todos os onze antimicrobianos testados (MAR = 1,00). As amostras apresentam condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, devido à presença de coliformes a 35°C, a 45°C e *E. coli*. Apresenta risco de veicular *A. hydrophila*, para o consumidor. Concluiu-se que a multirresistência dos isolados de *Aeromonas* spp. e *E. coli* foi considerada elevada. O aumento do aparecimento de bactérias resistentes a múltiplas drogas é preocupante, diminuindo as opções de uso de antimicrobianos com sucesso clínico.

Palavras-chave: Antibiograma. Micro-organismos. Coliformes. Peixe marinho. Feiras. Supermercados.

FRAZÃO, F. B. Microbiological quality and antimicrobial susceptibility profile of the bacteria isolated from the yellow hake (*Cynoscion acoupa*) commercialized in the city of São Luís - MA. 2018. 60f. Dissertation (Master in Animal Science) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2018.

SUMMARY

This work aimed to evaluate the microbiological quality and antimicrobial susceptibility profile of bacteria isolated from yellow hake commercialized in the city of. Sixty samples of fish from five supermarkets and five fairs were obtained from October 2016 to February 2017, which were analyzed at the Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água of the Universidade Estadual do Maranhão - UEMA. For the antimicrobial susceptibility profile, 53 isolates of *Aeromonas* spp. and four isolates of *Escherichia coli*. The in vitro antimicrobial susceptibility tests were performed by disk-diffusion, according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The selection of eleven antimicrobials was based on those most used in the human and veterinary clinic. Coliforms were observed at 35 ° C (93.33%), coliforms at 45 ° C (80%) and *E. coli* (13.33%). The presence of coliforms at 35 ° C (86.67%), coliforms at 45 ° C (46.67%) and presence of *E. coli* were observed in samples purchased from supermarkets. No samples showed contamination by Coagulase positive *Staphylococcus*, *Salmonella* spp., *Listeria* sp. and *V. parahaemolyticus*, for both commercialization environments. Four species of *Aeromonas* genus were isolated, the most frequent of which was *A. hydrophila*, in 43 (81.13%) samples. For the antimicrobial susceptibility profile, 53 isolates of *Aeromonas* sp. and four isolates of *Escherichia coli*. Increased resistance of *E. coli* to levofloxacin and sulfa-trimethoprim was observed; as well as antimicrobial resistance of *Aeromonas* spp. ampicillin, amoxicillin-clavulanate, cefuroxime and cefotaxime. The values found for the MAR index, evidenced multiresistance in 90.54% (n = 48) of the *Aeromonas* spp. and 50% (n = 2) of the *E. coli* isolates. A strain of *Aeromonas* spp. presented resistance to all eleven antimicrobials tested (MAR = 1.00). Research has shown that, in the treatment of infections caused by *E. coli*, piperacillin-tazobactam is most effective in vitro. For *Aeromonas* spp., The most effective antimicrobials in vitro were cefepime and levofloxacin. Thus, in case of diseases caused by this microorganism, these would be the antimicrobial of choice for the treatment of infections. Therefore, it was concluded that the multiresistance of *Aeromonas* spp. and *E. coli* was considered elevated. This is an important data since the increase of the appearance of bacteria resistant to multiple drugs is worrisome, diminishing the options of use of antimicrobial with clinical success. The samples presented unsatisfactory hygienic-sanitary conditions due to the presence of coliforms at 35°C, at 45°C and *E. coli*. It presents a risk of transmitting *A. hydrophila* to the consumer.

Keywords: Antibiogram. Microorganisms. Coliforms. Marine fish. Trade shows. Supermarkets.

LISTA DE TABELAS

CAPITULO II

- Tabela 1.** Variação mínima e máxima do número mais provável de coliformes a 35°C e a 45°C em 60 amostras de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializada em feiras e supermercados da cidade de São Luís - MA, 2017. 41
- Tabela 2.** Contagens médias de *Staphylococcus* coagulase negativo em amostras de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializadas em feiras e supermercados na cidade de São Luís - MA, 2017. 42
- Tabela 3.** Espécies de bactérias do gênero *Aeromonas* spp. isoladas de amostras de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializadas em feiras e supermercados na cidade de São Luís – MA, 2017. 43

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO III

- Quadro 1.** Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de isolados de *Escherichia coli* oriundos de amostras de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializada na cidade de São Luís – MA, 2017. 59
- Quadro 2.** Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de isolados de *Aeromonas* spp. oriundos de amostras de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializada na cidade de São Luís – MA, 2017. 59
- Quadro 3.** Índice de Múltipla Resistência aos Antimicrobianos (MAR) de isolados de *Aeromonas* spp. e *Escherichia coli* oriundos de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*), 2017. 59

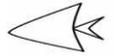
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHA	American Public Health Association
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CVS	Centro de Vigilância Sanitária
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
FAO	Food and Agriculture Organization
FAPEMA	Fundação e Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão
FDA	Food and Drug Administration
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NMP	Número Mais Provável
OMS	Organização Mundial de Saúde
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
sp.	Gênero
spp.	Espécies
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
UFC	Unidade Formadora de Colônia
LST	Lauril Sulfeto Triptose
VB	Verde Brilhante
EC	Escherichia coli
EMB	Eosina Azul de Metileno
MV	Vermelho de Metila
VP	Voges Proskauer
XLD	Xilose Lisina Desoxicolato
HE	Entérico Hektoen
TSI	Tríplice Açúcar Ferro

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Geral	16
2.2 Específicos.....	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
3.1 Características da pescada amarela (<i>Cynoscion acoupa</i>)	17
3.2 Alterações dos peixes <i>post-morte</i>	18
3.3 Condições higiênico-sanitária da infraestrutura X Qualidade do pescado	19
3.4 Bactérias de pescado importante em saúde pública	20
3.5 Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos	23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Local de obtenção das amostras e amostragem	25
4.2 Análises Microbiológicas	25
4.2.1 Preparo e diluição das amostras	25
4.2.2 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais, coliformes a 35°C e 45°C (BRASIL, 2003)	25
4.2.3 Pesquisa de <i>Escherichia coli</i> (BRASIL, 2003)	26
4.2.4 Contagem e identificação de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo e negativo (BRASIL, 2003)	26
4.2.5 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. (BRASIL, 2003).....	27
4.2.6 Pesquisa de <i>Aeromonas</i> spp. (SILVA, 2010).....	27
4.2.7 Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> (SILVA et al., 2010)	28
4.2.8 Pesquisa de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (Silva et al., 2010).....	29
4.2.9 Suscetibilidade antimicrobiana <i>in vitro</i> (CLSI, 2015).....	29
4.3 Análise Estatística dos Dados.....	30
REFERÊNCIAS.....	31
CAPÍTULO II.....	37
Artigo submetido ao Boletim do Instituto de Pesca.....	38
CAPÍTULO III	52
Artigo segundo as normas da Pesquisa Veterinária Brasileira.....	53
Anexos.....	60

CAPÍTULO I



1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o consumo de pescado, conforme as estimativas da FAO em 2013, alcançou 14,5 kg/hab./ano. Entretanto, uma estimativa divulgada pelo extinto Ministério da Pesca e Aquicultura-MPA, em 2015, indicou que este consumo nacional é de apenas 10,6 quilos de pescado *per capita*, ou seja, abaixo do recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (SNA, 2015).

Porém, ainda que o país não tenha alcançado o recomendado pela OMS, tem sido crescente a estimativa dos brasileiros consumirem pescado, em relação aos anos anteriores. Isso porque o Brasil tem aos poucos despertado para seu potencial. O País tem condições naturais excelentes para incentivar a pesca e aquicultura: água em abundância, com uma zona econômica exclusiva (ZEE) em rica de recursos pesqueiros, clima e geografia favoráveis a produção de espécies em cativeiro, apresenta uma grande biodiversidade tanto no mar quanto nos rios e lagoas, e uma produção significativa de grãos para fabricar ração.

Enfim, seja na pesca ou na aquicultura (continental ou marítima), o Brasil tem condições ideais para ofertar aos consumidores peixes, camarões, moluscos e outros organismos aquáticos em quantidade suficiente. Mas é preciso que além de quantidade, o pescado apresente boa qualidade, sem riscos à saúde do consumidor.

É importante ressaltar que a ausência de boas práticas de manipulação pelos pescadores e empresários na cadeia produtiva do pescado, por exemplo, é determinante para a baixa qualidade do produto brasileiro, que chega à mesa do consumidor com uma alta carga microbiana (LOPES, 2012).

Os micro-organismos, quando presentes no pescado, são determinantes na deterioração desse alimento, provocando assim uma possível rejeição pelo consumidor. Machado et al. (2015), relatam que a deterioração do pescado é facilitada devido os fatores intrínsecos e extrínsecos, podendo essa contaminação também se apresentar por meio de micro-organismos patogênicos com perfil de resistência a diferentes antimicrobianos.

Portanto, a adoção de medidas corretas na cadeia produtiva, como a conservação adequada por meio de refrigeração e a utilização de práticas higiênicas, podem diminuir

o risco de veiculação de agentes causadores de doenças, bem como possibilitar a obtenção de um produto de boa qualidade no final da cadeia produtiva (LOPES, 2012).

No Brasil, o pescado ao ser comercializado é fiscalizado pelos Serviços de Inspeção Federal (SIF), Serviços de Inspeção Estadual (SIE) ou Serviços de Inspeção Municipal (SIM). Todo controle e fiscalização de alimentos como o pescado envolve legislação própria (leis, decretos, resoluções, portarias, normas técnicas) (ORDÓÑEZ, 2005).

Na Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, por exemplo, consta a definição dos padrões microbiológicos para o pescado e os produtos derivados da pesca (BRASIL, 2001).

Alimentos fora dos padrões microbiológicos podem oferecer riscos à saúde pública, sendo as doenças transmitidas por alimentos (DTA) um problema frequente no mundo contemporâneo (AMSON et al., 2006).

No Brasil, no período de 2007 a 2017, 6.850 surtos de doenças transmitidas por alimentos foram registrados, tendo causado 109 mortes. Os alimentos frequentemente apontados nos surtos foram ovos e produtos à base de ovos, sobremesas, peixes e outro pescado, carne bovina, frango e suíno. Os principais agentes etiológicos foram as bactérias, principalmente *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (BRASIL, 2016; 2017).

Portanto, a importância epidemiológica que representa a identificação dos agentes etiológicos causadores de processos infecciosos no ser humano, associado ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos isolado em pescado, vem adquirir grande relevância para a saúde pública em todo o país (GUIMARÃES et al., 2012).

O Maranhão, por exemplo, destaca-se como um dos principais produtores de pescado oriundo da pesca extrativa marinha da região nordeste do país, apresentando recursos pesqueiros de grande importância econômica para o Estado, como a pescada amarela (*Cynoscion acoupa*), a gurijuba (*Hexanematichthys parkeri*), e pescada branca (*Cynoscion leiarchus*) (ALMEIDA, 2011; LOPES, 2012). Porém, vale ressaltar que mesmo que a pescada amarela, seja de grande importância econômica, existem poucos trabalhos científicos sobre características microbiológicas desta espécie e, até o presente

momento não existe pesquisa sobre o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas deste peixe.

A determinação do perfil de sensibilidade à antimicrobianos isolados de bactérias de peixes é fundamental na medida em que surgem cepas de micro-organismos resistentes a alguns antimicrobiano que, por isso, deixam de ser eficazes no tratamento das infecções (RODRIGUES, 2014).

Diante do exposto, neste trabalho é muito importante avaliar a qualidade microbiológica na pescada amarela *in natura*, comercializada na capital maranhense, e também o avaliar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana em bactérias isoladas deste peixe. Este trabalho subsidiará em informação e outras pesquisas, assim como contribuirá com futuras revisões na legislação sobre os padrões microbiológicos para o pescado e os produtos derivados da pesca, com a possibilidade de inclusão de outros patógenos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar a qualidade microbiológica e o perfil de suscetibilidade antimicrobiana das bactérias isoladas da pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializada na cidade de São Luís - MA.

2.2 Específicos

- Determinar o Número Mais Provável (NMP/g) de coliformes a 35°C e 45°C em amostras de pescada amarela comercializada na cidade de São Luís - MA;
- Pesquisar *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Aeromonas* spp., *Listeria monocytogenes* e *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de pescada amarela comercializada na cidade de São Luís - MA;
- Realizar a contagem e identificação de *Staphylococcus* coagulase positivo e negativo em amostras de pescada amarela comercializada na cidade de São Luís - MA;
- Avaliar a suscetibilidade *in vitro* dos micro-organismos isolados a antimicrobianos em amostras de pescada amarela.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Características da pescada amarela (*Cynoscion acoupa*)

A espécie *Cynoscion acoupa* (LACEPÉDE, 1801) é um peixe conhecido popularmente como pescada amarela da família Scianidae (FISH BASE, 2017).

Na costa brasileira foram descritas mais de 30 espécies dentro do gênero *Cynoscion*. Todos são peixes de escamas e apresentam a capacidade de produzir sons por músculos associados à bexiga natatória, caracterizando este grupo. Dentre as espécies principais deste gênero, está a pescada amarela, que pode alcançar 1,0 m de comprimento e 30 kg e tem a cor amarela. Ela possui grande distribuição geográfica, nas regiões Nordeste, Norte, Sudeste e Sul do litoral brasileiro (PESCATUR, 2016).

A pescada amarela apresenta como características: formato do corpo alongado; cabeça relativamente grande, que ocupa cerca de 1/4 do comprimento do corpo; boca terminal ampla e maxilas providas de pequenos dentes aciculares; nadadeira caudal romboidal; nadadeiras dorsais com raios duros e moles, bem altas e desenvolvidas; coloração geral amarelada, principalmente no dorso e na extremidade das nadadeiras (CUNHA; RODRIGUES, 2016).

Este peixe vive no mar, em águas rasas e salobras de estuários, e desembocaduras de rios, podendo habitar em água doce (ARAÚJO, 2008; HE et al., 2012). Entretanto, em fase juvenil, seus *habitats* são águas salobras e doces (ALMEIDA et al., 2016). Tem hábito carnívoro, sendo sua alimentação constituída de crustáceos como camarões, e de peixes (PESCATUR, 2016).

De acordo com Araújo (2008), a pescada costuma entrar nos manguezais a procura de alimentos, e acaba sendo alvo da pesca artesanal. É muito apreciada como alimento, sendo capturada em todo o litoral maranhense.

No Maranhão, a pescada amarela representa 10% da produção pesqueira. Tem grande valor comercial não apenas sua carne, mas também a bexiga natatória desta espécie. O produto conhecido como “grude” (oriundo da bexiga natatória), oriundo tanto de outros peixes como corvina e gurijuba, é usado para se obter uma gelatina

utilizada na indústria de bebidas (vinho e cervejas) como emulsificante e clarificante; a bexiga natatória também produz uma cola de alto teor de adesão, usada em operações cirúrgicas e a mesma também pode ser usada na composição de medicamentos, cosméticos, varas de pescar e móveis em vários países. Logo, atinge altos valores no mercado internacional (TRIBUNA AMAPAENSE, 2014; ALMEIDA et al., 2016).

3.2 Alterações dos peixes *post-morte*

Entende-se por pescado os peixes, os crustáceos, os moluscos, os anfíbios, os répteis, os equinodermos e outros animais aquáticos usados na alimentação humana (BRASIL, 2017).

Peixe é um alimento altamente perecível em decorrência dos fatores intrínsecos, da rápida instalação do *rigor mortis*, do pH próximo à neutralidade, da liberação do muco, da alta atividade de água nos tecidos, dos tecidos ricos em proteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos poli-insaturados que servem de substratos para as bactérias. Como qualquer animal, o peixe ao morrer, sofre uma série de alterações que levam à sua deterioração, principalmente se não forem aplicadas técnicas corretas de conservação (SANTOS; 2011).

O número de bactérias do muco e pele de peixes marinhos varia de 100 a vários milhões de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/cm². O fluido intestinal pode conter 10³ a 10⁸ UFC/ml e as brânquias podem conter 10³ a 10⁶ UFC/g. O muco contém bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Vibrio* e *Escherichia*. Tanto o número como as espécies das bactérias presentes no pescado vão influenciar na sua deterioração (GONÇALVES, 2011; MARINHO, 2011).

Para Santos (2011), a deterioração dos peixes é afetada pela composição química da musculatura, do número de espécies de micro-organismos presentes, pela ausência de refrigeração, condições higiênico-sanitárias deficientes e inadequado acondicionamento do pescado durante seu manuseio, armazenamento, transporte e comercialização. Do ponto de vista sensorial, as alterações dos peixes são facilmente percebidas após alguns dias de armazenamento.

Para retardar o processo de deterioração, o pescado exige alguns cuidados durante o manuseio, no processo de captura e durante a estocagem nos barcos pesqueiros. Qualquer alimento proveniente do mar sofre alteração devido a autólise, atividade bacteriana e/ou oxidação (VIEIRA, 2004).

Na autólise, após a morte do peixe, os sucos digestivos e as enzimas facilitam a disseminação de micro-organismos do trato intestinal e aceleram a deterioração dos tecidos musculares. A atividade bacteriana, o desenvolvimento micro-organismos juntamente com os processos de deterioração, acelera as alterações do pescado durante seu armazenamento. E a oxidação de gorduras insaturadas provoca alterações no aroma ou na coloração do pescado (MOPESCADOS, 2012).

3.3 Condições higiênico-sanitária da infraestrutura X Qualidade do pescado

Em São Luís - MA, no Portinho, o pescado que chega de embarcações oriundas de vários locais de pesca, ou ainda de caminhões frigoríficos de outros Estados, é distribuído em diversos estabelecimentos na capital maranhense (IABS, 2008). Sendo o principal foco de distribuição as feiras, mercados, supermercados, restaurantes e consumidores finais. Neste principal ponto de desembarque de pescado em São Luís, Pereira et al. (2010), verificaram ausência de infraestrutura, condições higiênico-sanitárias adequadas para realização das atividades, além da presença de depósitos de lixo a céu aberto e esgotos na área. Ainda, segundo estes autores, o desperdício é grande, sendo que enormes quantidades de peixes descartados e lançados nos manguezais.

Em Caxias - MA, Holanda et al. (2013) avaliaram as feiras livres e observaram que as instalações sanitárias impróprias. Alguns dos pontos negativos relatados por estes pesquisadores foram: pescado dispostos em estruturas de madeira no chão, e próximo do banheiro e muitos hábitos dos manipuladores inadequados.

Portanto, em feiras livres a comercialização de pescado é uma atividade que merece toda atenção, visto que o mesmo faz parte do grupo dos alimentos altamente perecíveis, e portanto, merece atenção da vigilância sanitária para assegurar aos consumidores produtos com boa qualidade higiênico-sanitária (XAVIER, 2009).

No pescado fresco, a qualidade é avaliada pelas características sensoriais. O peixe fresco deve apresentar carne firme, de consistência elástica e cor própria da espécie; com odor e sabor próprios, lembrando o de algas marinhas; olhos vivos e brilhantes; escamas brilhantes e bem aderentes à pele; nadadeiras apresentando certa resistência; e vísceras íntegras. Entretanto, em peixes filetados ou em postas congelados e conservas, estas características não são adequadas, dificultando a avaliação da qualidade (SANTOS, 2016).

Algumas práticas que podem ser adotadas tanto pelo pescador a bordo ou na indústria pesqueira durante o manuseio são recomendadas para garantir a qualidade do pescado, tais como evisceração, lavagem, sanitização, acondicionamento em gelo ou congelamento. Torna-se fundamental a observação do trinômio tempo x higiene x temperatura em todo processo (EVANGELISTA, 2010; VIEIRA, 2004).

3.4 Bactérias de pescado importante em saúde pública

No Brasil, o pescado geralmente tem chegado ao consumidor com carga microbiana elevada, composta tanto por micro-organismos deteriorantes como patogênicos. Bactérias como *Staphylococcus* coagulase positivo, coliformes, *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*; *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas* spp., entre outros, são exemplos de micro-organismos patogênicos ao ser humano, sendo o pescado contaminado o principal veiculador. A presença desses micro-organismos demonstra falhas em algumas etapas do processamento ou na conservação do produto final podendo interferir na saúde do consumidor, levando de uma simples intoxicação até a morte (REBOUÇAS, 2005; RIBEIRO, 2009; SOARES, 2012).

Vibrio parahaemolyticus é uma bactéria Gram negativa, bastonete curto, móvel, com flagelo polar, anaeróbia facultativa. Seu desenvolvimento ocorre em pH entre 7.5 e 8.5 e a temperatura entre 35°C a 37°C. Sendo pouco resistente ao calor e sua inativação ocorre pelo simples aquecimento do alimento. Esta bactéria foi isolada pela primeira vez no Japão, durante um surto de gastroenterite em 272 pessoas, resultando em 20 mortes. A ingestão de camarões, ostras e mexilhões crus ou mal cozidos, contaminados por *Vibrio parahaemolyticus* causa diarreia, náuseas, dores abdominais, vômito, febre, gastroenterite e calafrios. A doença dura cerca de dois dias, sendo o período de incubação de quatro a 96 horas (ROSA et al., 2017).

Staphylococcus aureus é uma espécie de bactéria Gram-positiva, esférica, apresentando com uma forma de pequenas cadeias ou em cachos. Os principais sintomas em casos de intoxicação alimentar são vômitos, náuseas, diarreia, sudorese, dores de cabeça e queda de pressão arterial (MANGOBA, 2015).

Staphylococcus aureus é de grande importância nos surtos de infecção alimentar. Segundo Barbosa (2013), este micro-organismo pode ser encontrado em várias partes do corpo humano como faringe, garganta, glândulas mamárias, mãos, urinário, e trato intestinal, dos quais por contaminação cruzada contamina o pescado. Todo cuidado é fundamental em indústrias de beneficiamento de pescado, visto que algumas pessoas podem ser portadoras de infecção respiratória ou cutânea, sendo responsáveis pela contaminação microbiológica desses alimentos, devido à falta de higiene do manipulador durante o início ao fim do processamento do pescado.

Em relação à inocuidade de peixes e produtos à base de pescado, a ANVISA estabelece que a tolerância de *Staphylococcus* coagulase positivo de 10^3 UFC/g e ausência de *Salmonella* spp. em 25g, para amostras indicativas de pescado, ovas de peixes, crustáceos e moluscos cefalópodes *in natura*, resfriados ou congelados não consumidos crus (BRASIL, 2001). Vale ressaltar, que não há limite de tolerância para coliformes para pescado *in natura* e produtos derivados de pescado (SANTOS, 2011).

Sobre as características microbiológicas da *Salmonella* spp., pode-se dizer que apresenta em forma de bastonetes curtos, Gram negativas, não esporulados, aeróbios facultativos ou anaeróbios. O pH ótimo para a multiplicação fica próximo de 7,0 e a temperatura ideal encontra-se na faixa de 35 °C a 37 °C (CARMELLO, 2013).

Salmonella spp. não pertence a microbiota natural do pescado, e portanto, o consumo desse alimento contaminado já causou inúmeras intoxicações alimentares (SANTOS, 2011). A salmonelose, doença causada por alimentos contaminados por *Salmonella* spp., apresenta alguns sintomas característicos no organismo humano como náuseas, vômito, febre, cólicas, cefaleia e diarreia (BARBOSA, 2013).

No estudo de Lopes et al. (2012), foram avaliadas as características microbiológicas da pescada amarela de Cedral - MA e verificou-se que a presença de coliformes nas amostras de pescada foram decorrentes do gelo contaminado utilizado durante a conservação do produto. Dias et al. (2010) ao avaliarem também a qualidade microbiológica dos peixes comercializados em feiras e mercados na cidade de

Imperatriz - MA, verificaram a contagem do número mais provável elevado por coliformes a 45 °C nas amostras analisadas.

Escherichia coli é a principal bactéria representante do grupo coliformes termotolerantes e é micro-organismo indicador de qualidade higiênico-sanitária do alimento, pois fornece informações de contaminação fecal e da eventual presença de organismos patogênicos, permitindo indicar também as condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento do alimento (BRASIL, 2001). A adoção de medidas de higiene pessoal dos manipuladores de alimentos é um fator determinante no controle das DTA's causadas por membros da família Enterobacteriaceae (SANTOS, 2011).

As bactérias do gênero *Aeromonas* são patógenos encontrados em uma grande diversidade de habitats (rios, ambientes estuarinos, lagoas, açudes, viveiros, entre outros). Distribuídos, principalmente, em ambientes dulcícolas, são considerados como componentes da microbiota associada a animais pecilotérmicos. Sendo comum encontrar este patógeno em peixes, por exemplo, e no ser humano por meio de doenças de veiculação hídrica (SILVA, 2010).

Quanto ao gênero *Listeria*, existem algumas espécies de importância na área de alimentos: *L. seeligeri*, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. murrayi*. Entretanto, a *L. monocytogenes* é uma espécie com grande enfoque na para saúde pública, sendo patogênica para seres humanos e animais (MARTINS, 2016). Segundo Franco e Landgraf (2008), afirmaram que *L. monocytogenes*, é um bacilo Gram-positivo, anaeróbico facultativo e não formador de esporos, se tornou um dos mais importantes patógenos veiculados por alimentos a partir da década de 80, devido à ocorrência de diversos surtos de listeriose humana.

Leite contaminado, água, vegetais crus, queijos, sorvetes, patês de carnes, aves cruas ou cozidas, peixes (defumados) e mariscos, têm sido os principais alimentos relacionados aos surtos em humanos. Há casos em que a *L. monocytogenes* pode ser transmitida da mãe para o feto, no útero ou no canal do parto (SILVA et al., 2007).

Segundo Caramelo (2013), *Listeria monocytogenes*, é uma das bactérias patogênicas mais encontradas na pele, brânquias e no intestino de peixes comercializados, juntamente com *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *V. parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila* entre outras.

3.5 Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos

No Brasil, termos como antibióticos e antimicrobianos são comumente confundidos pela maioria das pessoas. Leal et al. (2017) afirmam que antibióticos são substâncias naturais produzidas por micro-organismos, que inibem a multiplicação ou eliminam outros micro-organismos. Já os antimicrobianos se caracterizam por compostos químicos sintéticos (produzidos em laboratório) ou semi-sintéticos (modificados quimicamente em laboratório que matam ou inibem a multiplicação de micro-organismos).

Na Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 20, de 05 de maio de 2011 (BRASIL, 2011), o termo antimicrobiano é definido por “substância que previne a proliferação de agentes infecciosos ou micro-organismos ou que mata agentes infecciosos para prevenir a disseminação da infecção”.

Dias et al. (2010) afirmaram que as modificações genéticas na população microbiana podem desencadear a evolução de novos micro-organismos patogênicos e a formação de novos fatores de virulência em patógenos, como o desenvolvimento da resistência a antimicrobianos ou mudanças na habilidade de sobrevivência em condições ambientais adversas. E segundo a Organização Mundial da Saúde – OMS (2012), a resistência antimicrobiana não é um fenômeno novo e passou a ser vista como uma ameaça à eficácia dos tratamentos de infecções.

Diante desta problemática, no Brasil, em 2002, a ANVISA criou diretrizes nacionais para o uso racional de antimicrobianos. Com a resolução RDC Nº 20, de 05 de maio de 2011 (BRASIL, 2011), estes medicamentos passaram a ser vendidos apenas com receita médica, o que visa coibir e reduzir o uso indiscriminado dos antimicrobianos no país.

O uso indiscriminado tem contribuído para que os antimicrobianos e seus resíduos cheguem ao ambiente aquático, como por exemplo, pela excreção de animais domésticos e pela presença nos esgotos. Ao chegar ao ambiente, acabam entrando na cadeia alimentar dos seres humanos, através de alimentos como o pescado. A resistência microbiana pode ocorrer devido à ausência de mecanismos celulares necessários para a sensibilidade ou resistência adquirida, por meio de mutação e recombinação gênica, em

que materiais genéticos (plasmídeos e bacteriófagos) são passados de um micro-organismo para outro, mesmo pertencendo a espécies distintas (BOUFLEUER, 2015).

Vários são os métodos laboratoriais utilizados para verificar a sensibilidade *in vitro* de bactérias aos agentes antimicrobianos. Muitos laboratórios da área de microbiologia clínica adotam de forma rotineira, o método de disco-difusão em ágar. Este é um método simples, de baixo custo e confiável para verificar a suscetibilidade microbiana. Seu princípio é a difusão do antimicrobiano na superfície do ágar, a partir de um disco impregnado com o antimicrobiano, fazendo-se, em seguida, a leitura dos diâmetros das zonas de inibição, classificando-se o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos como resistente, intermediário ou sensível (NCCLS, 2003; ANVISA, 2008).

O teste de disco-difusão em ágar é um método de fácil interpretação pelos clínicos, e foi descrito pela primeira vez em 1966, por Bauer e Kirby. O teste fornece resultados qualitativos (BOUFLEUER, 2015).

Considerando que o pescado contaminado por bactérias patogênicas representa risco à saúde do consumidor, é importante identificar as bactérias presentes na pescada amarela comercializada em São Luís - MA, e seu perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, devido a grandes contagens de bactérias resistentes e multirresistentes no ambiente aquático que gera problemas em saúde pública.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de obtenção das amostras e amostragem

As 60 amostras da pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) foram obtidas em cinco supermercados e cinco feiras, no período de outubro de 2016 a fevereiro de 2017, na cidade de São Luís - MA. As amostras (500 g/postas) foram acondicionadas nas próprias embalagens e transportadas em caixas isotérmicas até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, onde foram analisadas.

4.2 Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas segundo a Instrução Normativa nº 62 de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2003), e o Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos (SILVA, 2010). As espécies de *Aeromonas* spp. foram identificadas segundo a chave de identificação Aerokey II (CARNAHAN *et al.*, 1991).

4.2.1 Preparo e diluição das amostras

No laboratório as amostras dos peixes foram retiradas de suas embalagens e pesados, assepticamente 25 g de cada amostra, para cada análise, adicionando-se a um frasco contendo 225 mL de água peptonada (diluição 10^{-1}). A partir desta diluição, foram preparadas as diluições 10^{-2} e 10^{-3} retirando-se alíquota de 1 mL e adicionando a 9mL de água peptonada, para obtenção de uma diluição 10^{-2} e assim sucessivamente até a diluição 10^{-3} . Para a análise de *Vibrio parahaemolyticus* seguiu-se a diluição até 10^{-4} .

4.2.2 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais, coliformes a 35°C e 45°C (BRASIL, 2003)

A partir das diluições decimais foram inoculados 1mL de cada amostra em três séries de três tubos de ensaio contendo caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) contendo tubos de Durham invertidos. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 35°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° , alíquotas das culturas positivas do caldo LST foram transferidas para tubos contendo caldo lactose bile verde-brilhante a 2% (VB). Incubados em estufa a $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas, sendo considerados positivos os tubos que apresentaram turvação e formação de gás.

Para confirmação dos testes de coliformes a 45°C , alíquotas das culturas positivas em caldo VB foram transferidas para tubos contendo caldo *Escherichia coli* (EC). Incubados em banho maria a $45^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Os resultados com produção de gás e turvação foram considerados positivos para coliformes a 45°C , e em seguida foi determinado o Número Mais Provável por grama de alimento (NMP/g), conforme tabela de Hoskiss (BRASIL, 2001).

4.2.3 Pesquisa de *Escherichia coli* (BRASIL, 2003)

Para a pesquisa de *Escherichia coli*, foram semeadas alíquotas de cada tubo positivo do caldo EC, em placas contendo ágar eosina azul de metileno (EMB) e foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24h. Após este período, foram selecionadas três colônias sugestivas (com brilho verde metálico) e transferidas para tubos de TSA inclinado, incubadas em estufa a $35^\circ\text{C}/24\text{h}$. Em seguida, foram realizados esfregaços corados pelo método de Gram, para a verificação da 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 do citrato (C), segundo a técnica descrita por Vanderzant e Splittsoesser (1992).

4.2.4 Contagem e identificação de *Staphylococcus* coagulase positivo e negativo (BRASIL, 2003)

A partir das diluições decimais ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$), alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas sobre a superfície de placas contendo ágar Baird-Parker (BP), adicionado de telurito de potássio e gema de ovo, distribuído em toda a placa com auxílio de alça de Drigalski e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C durante 48

horas. Após este período, foi realizada a contagem do número de colônias que apresentaram características típicas do gênero como: cor negra brilhante, zona de precipitação branca ao seu redor e circundada por um halo transparente, assim como a contagem das atípicas. As colônias típicas de *Stahylococcus* spp. foram submetidas à prova de catalase, que consiste em transferir a colônia com a alça de níquel-cromo previamente flambada, para uma lâmina de vidro onde foi adicionada uma gota de água oxigenada para observação de presença de borbulhamento imediato no caso de positiva. As colônias positivas para catalase foram transferidas para caldo o cérebro-coração (BHI) e incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente foi realizado o teste de coagulase utilizando plasma de coelho liofilizado.

4.2.5 Pesquisa de *Salmonella* spp. (BRASIL, 2003)

Para a etapa do pré-enriquecimento foram adicionados 25 gramas de cada amostra em frascos esterilizados contendo 225mL de solução de água peptonada a 0,1%. Os frascos foram incubados a 37°C por 24 horas.

Para o enriquecimento seletivo, com o auxílio de uma pipeta, foi transferido 1mL das amostras pré-enriquecidas para tubos contendo 10 mL de caldo selenito cistina, e 0,1 mL dessas mesmas amostras pré-enriquecidas para tubos contendo 10 mL de caldo rappaport-vassiliadis. Os tubos foram incubados a 41°C por 24 horas.

A partir do crescimento nos meios de enriquecimento, foram realizadas sementeiras em meio ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) e ágar entérico de Hektoen para (HE) plaqueamento seletivo, incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Após este período seguiu-se a identificação bioquímica, semeando as colônias típicas em ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e ágar lisina, incubadas a 37°C/24 horas. Os cultivos TSI e lisina positivos foram submetidos a prova de soro aglutinação rápida em placas, utilizando soros polivalente somático e flagelar, para identificação do gênero *Salmonella*.

4.2.6 Pesquisa de *Aeromonas* spp. (SILVA, 2010)

Foram pesados 25 gramas da amostra e adicionados em 225 mL do caldo tripticase soja (TSB) adicionado de ampicilina (30 mg/L) que foram incubadas a 28°C

por 24 h. Após este período, foram semeadas alíquotas do crescimento bacteriano em placas contendo ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina e ágar dextrina-ampicilina, segundo Havelaar e Vonk (1988), adicionadas com ampicilina (10mg/L) e incubadas a 28°C por 24 horas.

Para isolamento das colônias e identificação presuntiva do gênero, foram selecionadas colônias típicas (cor amarela, rodeadas por um halo transparentes), para cada um dos meios utilizados e semeados em ágar tripticase soja (TSA) inclinado e incubados a 28°C por 24 h.

Após a incubação, foi realizada a coloração pelo método de Gram e selecionadas as culturas que se apresentaram na forma de bastonetes retos e curtos, aos pares, isolados ou em cadeias curtas e Gram negativas. Estas foram repicadas em ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e incubadas a 28°C por 24 h sendo consideradas positivas as culturas que apresentaram reação ácida na base e bisel. As culturas positivas foram submetidas às provas de catalase e oxidase.

O teste da oxidase foi realizado conforme as instruções do fabricante (NewProv). A prova de catalase consistiu na transferência da colônia com a alça de níquel-cromo previamente flambada, para uma lâmina de vidro, sobre a qual foi adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio. A reação positiva foi caracterizada pela observação do borbulhamento imediato, como resultado de liberação de oxigênio. As cepas positivas nesses dois testes foram consideradas como pertencentes ao gênero *Aeromonas* e submetidas às provas bioquímicas para a identificação das espécies, segundo a chave de identificação Aerokey II (CARNAHAN et al., 1991) segundo os testes: hidrólise da esculina, produção de indol, produção de gás a partir de glicose, produção de ácido a partir da arabinose, Voges-Proskauer, sacarose e resistência à cefalotina (30µg).

4.2.7 Pesquisa de *Listeria monocytogenes* (SILVA et al., 2010)

Para a pesquisa de *L. monocytogenes*, 25 gramas foi homogeneizada em caldo de enriquecimento UVM (Caldo Universidade de Vermont) e incubadas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. O plaqueamento seletivo diferencial foi realizado por meio de estrias de esgotamento com auxílio de alça de níquel em placa de petri contendo ágar. As placas

foram incubadas a 35°C e observada a presença de colônias típicas com 24 horas de incubação. As colônias típicas no plaqueamento foram caracterizadas fenotipicamente através de provas bioquímicas baseadas na metodologia proposta por McClain; Le (1988), para identificação da espécie. Foram utilizadas as provas: tríplice açúcar e ferro, redução do nitrato a nitrito, urease, vermelho de metila, Voges-Proskauer, motilidade, fermentação de glicose, hidrólise da esculina e camp teste.

4.2.8 Pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* (Silva et al., 2010)

Para a pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus*, a partir das diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} previamente obtidas, foram transferidas alíquotas de 1 mL da solução mais concentrada para tubos de ensaio contendo 9 mL de solução água peptonada salina, adicionada de NaCl 3% e incubadas a 42°C por 24 horas.

Após o período de incubação, foi realizado o plaqueamento, a partir de cada tubo com crescimento, no qual coletou-se a massa de células da superfície e estriou-se em placa de Ágar TCBS e incubou-se a 37°C por 24 horas. As colônias sugestivas de pertencerem ao gênero *Vibrio* sp. foram repicadas em ágar TSA, e posteriormente coloração de Gram, oxidase e os testes bioquímicos. Para a identificação da espécie, foram realizados os testes bioquímicos: fermentação da glicose, redução de nitrato, hidrólise da arginina, produção de acetoina (Voges-Proskauer), teste vermelho de metila (VM) fermentação da lactose, hidrólise da esculina e motilidade. O NMP foi estimado para espécie de *Vibrio parahaemolyticus*, após a confirmação. Os resultados seriam expressos em NMP / 100 gramas de amostra.

4.2.9 Suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* (CLSI, 2015)

Foram utilizados meios e discos à temperatura ambiente. Foram suspensas com uso de alça bacteriológica colônias recentes em solução salina estéril (NaCl 0,85%) até se obter uma turvação compatível com o grau 0,5 da escala McFarland (1×10^6 UFC/mL). Com uso de swab estéril foi semeada a suspensão bacteriana em toda a superfície de placas de ágar de meio Mueller Hinton (MHA) utilizando-se alça de platina devidamente flambada e resfriada (18-24h). Com auxílio de pinça foram

colocados os discos de antimicrobianos, sobre a superfície do meio inoculado. As placas com os discos foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C + 2°C por 16 a 18 horas. Com o auxílio de uma régua, foi realizada medida do diâmetro dos halos inibitórios de cada disco, e com uso de tabela apropriada foi determinada a suscetibilidade ao antimicrobiano testado. Os antimicrobianos testados foram: ampicilina 10µg, gentamicina 120 µg, amicacina 30 µg, amoxicilina-clavulanato 30 µg, cefuroxima 30 µg, cefepime 30 µg, ceftaxima 30 µg, levofloxacina 5 µg, piperaciclina 100 µg, sulfatrimetoprim 25 µg.

4.3 Análise Estatística dos Dados

As análises estatísticas foram realizadas com *Statistica 7 Software* (STATSOFT, 2004). Para comparação da contagem e a ocorrência de micro-organismos nos diferentes locais de coleta (feiras e supermercados), os resultados foram submetidos a uma análise de variância ANOVA, utilizando um nível de significância de 5%. Na diferença entre as médias, foi aplicado o teste de Tukey.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Z. da S.; ISAAC, V. J.; PAZ, A. C.; MORAIS, G. C.; PORTO, H. L. R. Avaliação do potencial de produção pesqueira do sistema da pescada-amarela (*Cynoscion acoupa*) capturada pela frota comercial do Araçagi, Raposa, Maranhão. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, v.24, n.2, p.35-42, 2011.
- ALMEIDA, Z. da S.; SANTOS, N. B.; SOUSA, H. L. CARVALHO NETO, R. N. F.; ANDRADE, T. de S. de O. Biologia reprodutiva da pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) capturada na baía de São Marcos, Maranhão, Brasil. **Biota Amazônica**, v. 6, n. 1, p. 46-54, 2016.
- AMSON, G. V. HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos a ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agroecologia**, v.30, n.6, p.1139-1145, 2006.
- GONÇALVES, V. S. P.; SANTANA, A. P. S. Ocorrência e diferenciação de espécies de *Listeria* spp. em salsichas tipo hot dog a granel e em amostras de carne moída bovina comercializadas no Distrito Federal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.1, p.147-152, 2014.
- ANVISA - Agência Nacional de vigilância Sanitária. **Interpretação de dados microbiológicos**. 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos>. Acesso em: 07 dez. 2017.
- ARAÚJO, C. M. E. **Fauna acompanhante do Sistema de Produção Pesqueira Pescada Amarela (*Cynoscion acoupa*, PISCES: SCIANIDAE, LACEPÉDE 1802) desembarcada na praia do Araçagy, área do litoral da Ilha do Maranhão, Brasil: subsídios para sua conservação**. 2008. 85f. Dissertação (Mestrado em Sustentabilidade de Ecossistemas) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2008.
- BARBOSA, M. M. C. **Qualidade higiênico-sanitária e ocorrência de *Aeromonas* sp. e *Escherichia coli* em tilápias comercializadas no varejo**. 2013. 91 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.
- BOUFLEUER, É. M. dos S. **Diversidade e perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas em pisciculturas com diferentes densidades de estocagem**. 2015. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2015.
- BRASIL. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 158 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. **Métodos analíticos oficiais para análises**

microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água – Anexo. Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto 9.013 de 29 de março de 2017. **Dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal.** Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/3198817/mod_resource/content/1/DECRETO-N%C2%BA-9.013-DE-29-DE-MAR%C3%87O-DE-2017_RIISPOA.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2017.

BRASIL. **Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura.** 2010. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf>. Acesso em: 29 maio 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução - RDC n. 12 de 02/01/2001. **Regulamento Técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos.** Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de vigilância Sanitária (ANVISA), **Resolução - RDC n. 20 de 05/05/2011. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação.** Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/sngpc/Documentos2012/RDC%2020%202011.pdf>>. Acesso em: 08 dez. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil.** Maio de 2017. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf>>. Acesso em: 19 ago. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil.** Junho de 2016. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf>>. Acesso em: 19 ago. 2017.

CARAMELLO, L. E. **Qualidade microbiológica de peixes e frutos do mar comercializados em Botucatu-SP.** 2013. 33f. (Monografia em Ciências Biológicas. Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho-UNESP). Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/124322/000829187.pdf;sequence=1>>. Acesso em: 11 set. 2017.

CARNAHAN, A.M.; BEHRAM, S.; JOSEPH, S.W. Aerokey II: a flexible key for identifying clinical Aeromonas species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, n.1, p. 2843-2849, 1991.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. 2015.

Disponível em: <<https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?>>. Acesso em: 14 jul. 2017.

CUNHA, F. E. de A.; RODRIGUES, R. de C. A. Morfologia do tubo digestivo da pescada amarela *Cynoscion acoupa* (Lacepède, 1801) (Perciformes: Sciaenidae) no litoral Piauiense, Brasil. **Bioma Amazônica**, Macapá, v. 6, n. 4, p. 32-37, 2016.

DIAS, M. T.; SANTOS, P. C. R. F.; OLIVEIRA, L. A. T.; MARTINS, V. A. Avaliação da sensibilidade de cepas de *Escherichia coli* isoladas de mexilhões (*Perna perna* Linnaeus, 1758) à antimicrobianos. **Ciências Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 30(2): 319-324, 2010.

DIAS, V. L. N.; FERREIRA, E. F.; CORÉIA, G. A.; SILVA, E. C. R.; OLIVEIRA, I.N.; MOUCHREK FILHO, V. E. et al. Avaliação da qualidade de peixe comercializado em Imperatriz – MA. **Higiene Alimentar**, Imperatriz, v. 24, n.187, p.109-120. 2010.

EVANGELISTA, W. P. **Prevalência de histamina em peixes escombrídeos e intoxicação histamínica no Brasil de 2007 a 2009**. 2010. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)- Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, 2010.

FISH BASE. *Cynoscion acoupa*. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/summary/1169>>. Acesso em: 01 set. 2017.

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

GONÇALVES, A. A. **Tecnologia de pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo: Editora Atheneu, 2011. 624p.

GUIMARÃES, A. G.; CARDOSO, R. de C. V.; AZEVEDO, P. F.; MENESES, R. B. de. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos coalho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.71, n.2, p.259-265, 2012.

HAVELAAR, A. H.; VONK, M. The preparation of ampicillin dextrin Ágar for the enumeration of *Aeromonas* in water. **Letters in Applied Microbiology**, v.7, n.6, p.169-171,1988.

HOLANDA, M. F. A; SILVA, M. A. M. P; PINTO, L. I. F; BRANDÃO, T. M; SILVA, R. A. Avaliação das condições higiênicas-sanitárias das feiras livres de comercialização de peixe de Caxias-MA. **Acta Tecnológica**, v.8, n.2, p. 30-35, 2013.

IABS. **Complexo pesqueiro em São Luís Maranhão**. Brasília: IABAS, 2008.

LACEPÈDE, B. G. E. **Histoire naturelle des poissons**. v.3, p. 1-34, 1801.

LEAL C. A. G., OLIVEIRA T. F.; FIGUEIREDO H. C. P. Antibacterianos na piscicultura: erros, acertos e riscos. **Revista Panorama da Aquicultura**, v.27, n.162, p.14-23, 2017.

LOPES, I. S.; FERREIRA, E.M; PEREIRA, D. M.; PEREIRA, L. S.; CUNHA, M. C. S.; COSTA, F. N. Pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) desembarcada: características microbiológicas e qualidade do gelo utilizado na sua conservação. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.71, n.4, p:677-84, 2012.

MACHADO A. L., ARAÚJO R. L., SOUSA O. V. de.; VIEIRA R. H. S. dos F. Resistência antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* isoladas de pescado marinho comercializado na feira livre do Mucuripe - Fortaleza-CE, Brasil. Boletim do Instituto de Pesca, v. 41, n.4, p.931–943, 2015.

MANGOBA, P. M. A. **Prospecção de característica fitoquímicas, antibacterianas e físico-químicas de *Portulaca oleracea* L. (beldroega)**. 2015. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

MARINHO, L. S. **Crítérios para avaliação da qualidade da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) inteira estocada em gelo**. 2011. 111f. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal)- Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2011.

MARTINS, A. P. Atividade bactericida de antimicrobianos naturais sobre *Listeria monocytogenes* inculada em mortadela. 2016. 163f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)- Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2016.

MOPESCADOS. **Deterioração de peixes**. Disponível em: <<https://mopescados.wordpress.com/2012/05/21/deterioracao-de-peixes/>>. Acesso em: 09 dez. 2017.

NCCLS 2003. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard. 8rd ed. NCCLS document: Pennsylvania. 58p. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf> Acesso em 17 maio 2017.

OMS- Organização Mundial de Saúde. A crescente ameaça da resistência antimicrobiana. 2012. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75389/3/OMS_IER_PSP_2012.2_por.pdf?ua=1>. Acesso em: 13 dez. 2017.

ORDÓÑEZ, A. O. **Tecnologia de Alimentos**. 1ª ed. São Paulo: Ed. Artmed, 2006. 280p.

PEREIRA, T. de J. F.; FERREIRA, L. K. S.; EVERTON, F. A.; FRAZÃO, F. B.; LIMA, M. de F. V. Comercialização de pescado no Portinho em São Luís, Estado do Maranhão, Brasil: uma abordagem socioeconômica dos trabalhadores. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, São Luís, v. 5, n.3, 2010, p.1-8.

PESCATUR. **Pescada amarela**. Disponível em: <<http://www.pesca.tur.br/peixes/agua-salgada/pescada-amarela/>>. Acesso em: 26 maio 2016.

REBOUÇAS, R. H. **Staphylococcus coagulase positiva em camarão marinho sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) comercializado na feira-livre de pescado do Mucuripe**. Monografia (Curso de Engenharia de Pesca)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

RIBEIRO, A. L. M. dos S.; OLIVEIRA, G. M. de; FERREIRA, V. de M.; PEREIRA, M. M. D.; SILVA, P. P. O. Avaliação microbiológica da qualidade do pescado processado, importado no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 3, p. 109-112, 2009.

RODRIGUES, J. **Testes de Susceptibilidade aos antimicrobianos**. 2014. Disponível em <<http://www.fcencias.com/2014/01/23/testes-de-susceptibilidade-aos-antimicrobianos-laboratorio-online/>>. Acesso em: 02 dez. 2017.

ROSA, J. V. da; KAEFER, K.; CONCEIÇÃO, N. V. da; CONCEIÇÃO, R. C. S. da; TIMM, C. D. Formação de biofilme por *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescado. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.37, n.4, p. 339-345, 2017.

SANTOS, A. P. B. dos. **Índices químicos, sensoriais e microbiológicos para a avaliação do frescor de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) armazenada em gelo**. 2011. 95f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia e Engenharia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

SANTOS, P. C. de M. Qualidade dos peixes comercializados na feira livre do município de Formiga - MG. 2016. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação de Medicina Veterinária) - UNIFOR-MG, Formiga, 2016.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4ª ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010. 552p.

SILVA, R. M. L. **Bactérias do gênero *Aeromonas* e indicadores de qualidade da água em pisciculturas da Região da Baixada Ocidental Maranhense**. 2010. 75 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias e Veterinárias) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

SNA. **Consumo de pescado no Brasil está abaixo do recomendado pela OMS**. 2015. Disponível em: <<http://sna.agr.br/consumo-de-pescado-no-brasil-esta-abaixo-do-recomendado-pela-oms/>>. Acesso em: 07 ago. 2017.

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

TRIBUNA AMAPAENSE. **Grude da gurijuba**. 2014. Disponível em: <<https://tribunaamapaense.blogspot.com.br/2014/04/grude-da-gurijuba-o-ouro-do-pescado.html>>. Acesso em: 01 set. 2017.

VANDERZANT, C; SPLITT-STOESSER, D. F. **Compendium of Methods for the microbiological. Examination of food, American Public Health Association.** APHA: Washington D.C. 1992.

VIEIRA, R.H.S.F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática.** São Paulo: Varela, 2004. 370 p.

XAVIER, A. Z. P., VIEIRA, G. D. G., RODRIGUES, L. O. M., VALVERDE, L. O. V., PEREIRA, V. S. **Condições higiênico-sanitárias das feiras-livres do município de Governador Valadares.** 2009. 95f. Monografia (Curso de Nutrição). Faculdade de Ciências da Saúde, Minas Gerais, 2009.

CAPÍTULO II

Artigo submetido ao Boletim do Instituto de Pesca (número de registro BIP-333)
(Qualis B1)

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA PESCADA AMARELA COMERCIALIZADA EM SÃO LUÍS-MA

Fabiana Borralho FRAZÃO¹, Lygia Silva GALENO¹, Hortência Regina Maramaldo NUNES¹, Isadora Fontenelle Carneiro de CASTRO¹, Isabel Azevedo CARVALHO¹, Francisca Neide COSTA^{1*}

Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água, Universidade Estadual do Maranhão-UEMA, CEP: 65055-310, Brasil. *E-mail: francisca.cca.uema@gmail.com

RESUMO

O trabalho objetivou avaliar a qualidade microbiológica da pescada amarela comercializada na cidade de São Luís - MA. Foram obtidas 60 amostras de postas de peixe de cinco supermercados e cinco feiras, no período de outubro de 2016 a fevereiro de 2017, as quais foram analisadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA. Nas amostras oriundas de feiras foi verificada a presença de coliformes a 35°C (93,33%), coliformes a 45°C (80%) e *E. coli* (13,33%). Nas amostras adquiridas dos supermercados, foi observada presença de coliformes a 35°C (86,67%), coliformes a 45°C (46,67%) e não foi detectada a presença de *E. coli*. Nenhuma amostra apresentou contaminação por *Staphylococcus* coagulase positivo, *Salmonella*, *Listeria* sp. e *V. parahaemolyticus*, para ambos os ambientes de comercialização. Foram isoladas quatro espécies do gênero *Aeromonas*, sendo que a mais frequente foi *A. hydrophila*, em 43 (81,13%) amostras. Então, concluiu-se que as amostras apresentam condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, devido a presença de coliformes a 35°C, a 45°C e *E. coli*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* biovar *veronii* e *A. schubertii*.

Palavras-chave: microbiologia; bactérias; peixe marinho; feiras; supermercados.

MICROBIOLOGICAL QUALITY OF YELLOW HAKE MARKETED IN THE CITY OF SÃO LUÍS-MA

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the microbiological quality of yellow hake commercialized in the city of São Luís - MA. Sixty samples of fish from five supermarkets and five fairs were obtained from October 2016 to February 2017, which were analyzed at the Laboratory of Food and Water Microbiology of the Universidade Estadual do Maranhão - UEMA. The presence of coliforms at 35 ° C (93.33%), coliforms at 45 ° C (80%) and *E. coli* (13.33%) were observed in the samples analyzed. However, in samples purchased from supermarkets, the presence of 86.67% was observed for coliforms at 35 ° C, 46.67% for coliforms at 45 ° C and the

48 coagulase positive *Staphylococcus*, *Salmonella* spp., *Listeria* sp. and *V.*
49 *parahaemolyticus*, for both commercialization environments. Four species of
50 *Aeromonas* genus were isolated, the most frequent of which was *A.*
51 *hydrophila*, in 43 (81.13%) samples. It was concluded that the samples
52 present unsatisfactory hygienic-sanitary conditions due to the presence of
53 coliforms at 35°C, at 45°C and *E. coli*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* biovar
54 *veronii* and *A. schubertii*.

55 **Keywords:** microbiology; coliforms; bacteria; sea fish; fairs; supermarkets.

56
57
58
59

INTRODUÇÃO

60 Na costa brasileira já foram descritas mais de 30 espécies dentro do gênero
61 *Cynoscion*. Todos são peixes que possuem escamas e apresentam a capacidade de
62 produzir sons por músculos associados à bexiga natatória, o que caracteriza este grupo.
63 Dentre as espécies principais deste gênero, está a espécie *Cynoscion acoupa*: um peixe da
64 família Scianidae conhecido popularmente como pescada amarela (ALMEIDA *et al.*,
65 2016; FISH BASE, 2017).

66 A pescada amarela pode alcançar 1,0 m de comprimento, pesar até 30 kg e tem
67 a cor amarela. Possui distribuição geográfica por todo o litoral brasileiro. Ela apresenta
68 como características: formato do corpo alongado; cabeça relativamente grande; boca
69 terminal ampla e maxilas providas de pequenos dentes aciculares; nadadeira caudal
70 romboidal; nadadeiras dorsais com raios duros e moles, bem altas e desenvolvidas;
71 coloração geral amarelada, principalmente no dorso e na extremidade das nadadeiras
72 (PESCATUR, 2016). No Brasil, este peixe destacou-se como a terceira espécie mais
73 capturada (20.879 ton.) (BRASIL, 2010).

74 Na região Nordeste, o Estado do Maranhão destaca-se como um dos principais
75 produtores de pescado de origem extrativista, apresentando recursos pesqueiros de
76 grande importância econômica para o estado, entre eles a pescada amarela (ALMEIDA,
77 2011; LOPES, 2012).

78 Segundo LOPES *et al.* (2012), a pescada amarela apresenta essa importância
79 principalmente por ser um alimento proteico, com baixo teor de gorduras saturadas,
80 rico em vitaminas, minerais essenciais e em ácidos graxos ômega-3. Portanto, a sua
81 qualidade deve ser priorizada em razão de ser um alimento altamente perecível (por
82 apresentar alta atividade de água, pH próximo à neutralidade, entre outros fatores) e
83 favorecer o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos prejudiciais à saúde
84 dos consumidores. Assim, para que seja assegurada a sua qualidade, é necessário que
85 haja uma inter-relação entre tempo, higiene e temperatura; evitando o

86 desencadeamento de reações autolíticas e/ou bacterianas, que interferem na segurança
87 do produto (SOARES e GONÇALVES, 2012).

88 Alimentos fora dos padrões microbiológicos podem oferecer riscos à saúde
89 pública, sendo as doenças transmitidas por alimentos (DTAs) um problema frequente
90 no país. No período de 2007 a 2017, 6.850 surtos de doenças transmitidas por alimentos
91 foram registrados no Brasil, tendo causado 109 mortes. Os principais agentes
92 etiológicos dessas DTA's foram: *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e
93 *Bacillus cereus* (BRASIL, 2016; BRASIL, 2017).

94 Portanto, aliados aos testes sensoriais e físico-químicos, os métodos de análise
95 microbiológica devem também ser feitos na avaliação da qualidade dos alimentos,
96 entre eles pescados e derivados da pesca (GONÇALVES, 2011).

97 No Maranhão, ainda que a pescada amarela seja de grande importância
98 econômica, existem poucos trabalhos científicos sobre características microbiológicas
99 desta espécie. De acordo por PEREIRA *et al.* (2010), a pescada amarela, assim como
100 outro pescado, chega a São Luís - MA, em embarcações oriundas de vários locais de
101 pesca, ou em caminhões frigoríficos de outros Estados, e é distribuída em diversos
102 estabelecimentos na capital maranhense. Os principais locais de distribuição são as
103 feiras, mercados, supermercados e restaurantes. Estes autores verificaram ausência de
104 infraestrutura e condições higiênico-sanitárias adequadas para realização das
105 atividades, além da presença de depósitos de lixo a céu aberto e esgotos na área do
106 Portinho, o principal ponto de desembarque de pescado em São Luís.

107 Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho avaliar a qualidade
108 microbiológica da pescada amarela comercializada na cidade de São Luís - MA.

109

110 MATERIAL E MÉTODOS

111

112 No período de outubro de 2016 a fevereiro de 2017, 60 amostras de pescada
113 amarela (*Cynoscion acoupa*) foram obtidas em cinco supermercados e cinco feiras, na
114 cidade de São Luís - MA. As amostras (500 g/posta) foram acondicionadas nas
115 próprias embalagens e transportadas em caixas isotérmicas até o Laboratório de
116 Microbiologia de Alimentos e Água da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA,
117 para análises.

118 No laboratório, assepticamente, as amostras foram retiradas de suas
119 embalagens originais e foram pesados 25 g de cada amostra, para cada análise, que

120 foram adicionados a um frasco contendo 225 mL de água peptonada (diluição 10⁻¹),
 121 seguindo-se com diluições seriadas até 10⁻³ e até 10⁻⁴ para a análise de *Vibrio*
 122 *parahaemolyticus*.

123 As análises microbiológicas foram realizadas segundo a Instrução Normativa nº
 124 62 de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL,
 125 2003), e o Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos (SILVA, 2010).
 126 As espécies de *Aeromonas* spp. foram identificadas segundo a chave de identificação
 127 Aerokey II (CARNAHAN *et al.*, 1991).

128 As análises estatísticas foram realizadas com Statistica 7 Software (STATSOFT,
 129 2004). Para comparação da contagem e a ocorrência de micro-organismos nos
 130 diferentes locais de coleta (feiras e supermercados), os resultados foram submetidos a
 131 uma análise de variância ANOVA, utilizando um nível de significância de 5%. Na
 132 diferença entre as médias, foi aplicado o teste de Tukey.

133

134 RESULTADOS

135

136 A tabela 1 apresenta os resultados das análises microbiológicas para coliformes
 137 das 30 amostras de pescada amarela provenientes de feiras livres e 30 amostras
 138 oriundas de supermercados em São Luís - MA.

139 Nas amostras oriundas de feiras foi observada ausência de coliformes a 35°C
 140 (<3 NMP/g) em 2 (6,67%) amostras; 27 (90%) amostras apresentaram contagens em um
 141 intervalo de 3 a 460 NMP/g e apenas uma (3,33%) apresentou contagem ≥ 1.100
 142 NMP/g (Tabela 1). Para coliformes a 45°C foi verificada ausência (<3NMP/g) em 6
 143 (20%) amostras e 24 (80%) amostras apresentaram contagens entre 3 e 460 NMP/g. Foi
 144 também detectada a presença de *E. coli* em 4 (13,33%) das amostras de feiras livres
 145 analisadas.

146

147 **Tabela 1.** Variação mínima e máxima do número mais provável de coliformes a 35°C e
 148 a 45°C em 60 amostras de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializada em feiras
 149 e supermercados da cidade de São Luís - MA, 2017.

NMP/g ¹ de	FEIRAS		SUPERMERCADOS	
	n(%)		n(%)	
Coliformes	35°C	45°C	35°C	45°C
<3	2 (6,67)	6(20)	4(13,33)	16(53,33)
3 a ≤460	27 (90)	24(80)	24(80)	14(46,67)
≥1100	1(3,33)	0(0)	2(6,67)	0(0)
Total	30(100)	30(100)	30(100)	30(100)

150

¹ NMP/g; Número Mais Provável por grama; n(%) = número de amostras(porcentagem)

151

152 Em relação aos dados obtidos das análises microbiológicas das amostras
 153 adquiridas nos supermercados (Tabela 1). Em quatro (13,33%) amostras não foram
 154 detectados coliformes a 35°C, 24 (80%) amostras apresentaram contagens em um
 155 intervalo de 3 a 460 NMP/g e duas (6,67%) apresentaram valores ≥ 1.100 NMP/g.
 156 Quanto aos coliformes a 45°C foi verificada ausência (< 3 NMP/g) em 16 (53,33%)
 157 amostras analisadas, em 14 (46,67%) observaram-se contagens que variaram de 3 a 460
 158 NMP/g e nenhuma das amostras analisadas apresentou valores ≥ 1.100 NMP/g.
 159 Também não foi detectada a presença de *E. coli* nas amostras obtidas nesses
 160 estabelecimento.

161 Nenhuma amostra apresentou contaminação por *Staphylococcus* coagulase
 162 positivo para os dois ambientes de comercialização. Para *Staphylococcus* coagulase
 163 negativo, foram verificadas contagens inferiores a 20 UFC/g em sete (23,33%) amostras
 164 provenientes de feiras. De modo geral, verificaram-se contagens médias entre $3,8 \times 10^3$ a
 165 $1,4 \times 10^5$ UFC/g. Entretanto, em relação à presença desta bactéria em supermercados,
 166 verificou-se em oito amostras (26,67%) contagens inferiores a 20 UFC/g. E contagens
 167 médias entre $3,9 \times 10^3$ a $4,1 \times 10^4$ UFC/g.

168 Na tabela 2, houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as contagens
 169 médias de *Staphylococcus* coagulase negativo entre feiras ($4,8 \times 10^4 \pm 5,9 \times 10^4$) e
 170 supermercados ($1,4 \times 10^4 \pm 1,5 \times 10^4$). Pode-se verificar que, nas feiras, houve maior
 171 contaminação por esta bactéria em relação aos supermercados.

172

173 **Tabela 2.** Contagens médias de *Staphylococcus* coagulase negativo em amostras de
 174 pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializadas em feiras e supermercados na
 175 cidade de São Luís - MA, 2017.

Local de coleta	Número de amostras	Média de UFC ¹ /g de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo
Feiras	30	$4,8 \times 10^{4a} (\pm 5,9 \times 10^4)^*$
Supermercados	30	$1,4 \times 10^{4b} (\pm 1,5 \times 10^4)$

176 Coeficiente de variação (CV) das feiras =123,06%

177 Coeficiente de variação (CV) dos supermercados =106,93%

178 *Média (\pm Desvio Padrão)

179 ¹ UFC/g: Unidade Formadora de Colônia por grama

180 ^{a,b}Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença estatística.

181

182 Bactérias do gênero *Aeromonas* spp. foram identificadas em 53 (88,33%)
 183 amostras analisadas. Verificou-se a ocorrência de quatro espécies, sendo elas: *A.*
 184 *hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* biovar *veronii* e *A. schubertii*. A mais frequente foi *A.*
 185 *hydrophila*, em 43 amostras (81,13%), conforme Tabela 3.

186
 187 **Tabela 3.** Espécies de bactérias do gênero *Aeromonas* spp. isoladas de amostras de
 188 pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializadas em feiras e supermercados na
 189 cidade de São Luís - MA, 2017.

ESPÉCIES	PONTOS DE COMERCIALIZAÇÃO										TOTAL n(%)
	FEIRAS					SUPERMERCADOS					
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
<i>A. hydrophila</i>	4	3	6	6	4	5	5	4	2	4	43(81,13)
<i>A. veronii</i> biovar <i>veronii</i>	2	1	-	-	-	1	-	-	2	-	6(11,32)
<i>A. schubertii</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1(1,89)
<i>A. caviae</i>	-	-	-	-	1	-	-	2	-	-	3(5,66)
Total	6	4	6	6	5	6	6	6	4	4	53(100)

190

191 Na pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus*, não foram identificadas colônias
 192 sugestivas deste micro-organismo. Considerando-se que o meio ágar TCBS é específico
 193 para identificação de bactérias do gênero *Vibrio* sp., relata-se a possível ocorrência de
 194 outras espécies, que foram observados pelo aparecimento de colônias no referido ágar.

195 Observou-se ausência de *Vibrio* spp. em 48 (80%) das amostras analisadas. Nas
 196 12 (20%) amostras em que foi identificado o gênero, a contagem variou de 3 a 35
 197 NMP/g.

198 Assim como para *Vibrio parahaemolyticus*, não foi identificado a presença
 199 *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* nas amostras analisadas.

200

201 DISCUSSÃO

202

203 Apesar de a legislação brasileira não possuir padrões para peixe *in natura*, no
 204 que se refere a coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C (BRASIL, 2001; SOARES *et al.*,
 205 2011; SANTOS, 2016), tais análises foram realizadas, pois a presença desses micro-
 206 organismos indica condições higiênico-sanitárias do pescado.

207 Os possíveis motivos para a contaminação das amostras analisadas por
 208 coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C podem estar relacionados a: ausência de
 209 equipamentos de proteção individual - EPI's por parte dos manipuladores, exposição
 210 de peixes em bancadas por longas horas (sem o adequado armazenamento no gelo), ao

211 sol, ao trânsito de carros, pessoas, insetos, banheiros e lixo disposto em local
212 impróprio. Estes motivos podem ter favorecido a contaminação dos peixes, e, portanto,
213 recomenda-se a intensificação das ações de vigilância sanitária nesses locais e a
214 melhoria das condições de infraestrutura das feiras avaliadas de São Luis - MA. Para
215 reduzir a contaminação de origem fecal, faz-se também necessária a conscientização
216 dos manipuladores quantos aos quesitos de higiene pessoal a serem obedecidos.

217 Vale considerar que este último critério é fundamental para ser aplicado em
218 vários setores da cadeia produtiva da pescada amarela, desde o ato da captura a bordo,
219 desembarque em portos, durante o processamento, até chegar ao consumidor final com
220 uma qualidade microbiológica satisfatória.

221 Outros estudos já comprovaram a presença de coliformes a 35 °C, coliformes a
222 45 °C e *E. coli* em amostras de pescada desembarcadas nos principais municípios
223 pesqueiros do Estado (LOPES *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2014). Esse fato mostra a
224 importância de adotar práticas de higiene pessoal não somente durante a
225 comercialização em feiras e supermercados, como também no início da cadeia
226 produtiva do pescado, como por exemplo, durante a captura e desembarque em
227 portos.

228 Ao comparar os dados registrados entre feiras e supermercados, na tabela 1,
229 podem ser verificadas as contagens de NMP/g em percentuais mais elevados nas
230 amostras oriundas de feiras, o que pode ser explicado pelas condições higiênico-
231 sanitárias locais, que são precárias na capital maranhense, conforme já relatado por
232 FREITAS (2014). Quanto aos supermercados, os resultados expostos nesta tabela,
233 podem ter sido influenciados pela melhor infraestrutura dos estabelecimentos quando
234 comparados às feiras. Além disso, as empresas são obrigadas a fornecer EPI's de forma
235 gratuita ao trabalhador conforme norma regulamentadora trabalhista NR-06 (BRASIL,
236 2015), contribuindo para redução de contaminação alimentar de origem fecal.

237 Por sua vez, mesmo que verificada a ausência de *E. coli* e baixas contagens de
238 coliformes nas amostras de pescada amarela provenientes de supermercados, alguns
239 autores (BALDIN, 2011; LOPES *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2014), mostram que o gelo
240 utilizado para conservar o pescado pode atuar como veículo de micro-organismos,
241 pelo fato de a água utilizada estar fora dos padrões de potabilidade. Este fato pode ser
242 um dos fatos associados à contaminação observada nas amostras do presente estudo.

243 A quantidade de gelo recomendada para conservação é de uma relação de 1:1
244 (pescado/gelo). O uso do gelo dentro dos padrões de potabilidade e a refrigeração

245 adequada levam à diminuição da temperatura, reduzindo e retardando o processo de
246 deterioração, prologando a vida de prateleira dos peixes e seu estado de frescor
247 (MASSARO e YURI, 2016).

248 A exposição de peixes em bancadas por longas horas e ainda a manipulação dos
249 consumidores são outros fatores que interferem nas contagens de NMP/g e presença
250 de *E. coli* em percentuais mais elevados nas amostras oriundas de feiras.

251 Quanto as análises de *Staphylococcus* coagulase positivo, nenhuma amostra
252 apresentou contaminação, visto que está em conformidade com a RDC nº 12, de 2 de
253 janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL,
254 2001), que estabelece como contagem máxima 10^3 UFC/g. Contudo, mesmo que esta
255 resolução estabeleça padrões apenas para *Staphylococcus* coagulase positivo, é
256 importante chamar atenção para a contagem de *Staphylococcus* coagulase negativo nos
257 alimentos. LAMAITA (2003) descreve a necessidade de revisão da legislação brasileira,
258 para que inclua padrões para *Staphylococcus* coagulase negativo, dada sua importância
259 do ponto de vista de segurança alimentar, podendo indicar falhas de higiene
260 associadas com processos de conservação inadequados (resfriamento,
261 descongelamento ou estocagem). Também já foi identificada por PCR uma capacidade
262 toxigênica de *Staphylococcus* coagulase negativo isolados de alimentos (CUNHA, 2006;
263 LOPES *et al.*, 2012).

264 As contagens médias de $3,8 \times 10^3$ a $1,4 \times 10^5$ UFC/g de *Staphylococcus* coagulase
265 negativo em feiras e de $3,9 \times 10^3$ a $4,1 \times 10^4$ UFC/g em supermercados nas amostras
266 analisadas, indicam manipulação inadequada da pescada amarela nestes
267 estabelecimentos. Considerando que uma porcentagem significativa da população é
268 portadora assintomática de *Staphylococcus* sp., deve-se adotar hábitos higiênicos
269 durante a manipulação do pescado. O contato das mãos com a pele, mucosas nasal e
270 oral, sem posterior higienização das mesmas, contamina o peixe durante a
271 manipulação.

272 No estudo de LOPES *et al.* (2012), também nenhuma amostra apresentou
273 contaminação por *Staphylococcus* coagulase positivo, porém, foram detectadas
274 contagens médias entre 2×10^3 a $3,1 \times 10^5$ UFC/g de *Staphylococcus* coagulase negativo
275 em pescada amarela desembarcada no porto de Cedral - MA, o que corrobora com a
276 presente pesquisa.

277 A maior contaminação por *Staphylococcus* coagulase negativo encontrada nas
278 feiras em relação aos supermercados (tabela 2), com diferença estatística significativa,

279 se deve, provavelmente, a condições higiênico-sanitárias inadequadas das feiras,
280 deficiência de higiene pessoal na maioria dos manipuladores (feirantes e/ou
281 pescadores) e ausência de bancadas com refrigeração usadas para manipulação e
282 armazenamento do pescado à venda.

283 Quanto às bactérias do gênero *Aeromonas* em pescada amarela (tabela 3), foi
284 encontrado um maior percentual de isolados para *A. hydrophila* nas amostras
285 analisadas, comparadas às espécies *A. caviae*, *A. veronii* biovar *veronii* e *A. schubertii*. A
286 presença de bactérias do gênero *Aeromonas* pode ser devida a uma possível
287 contaminação cruzada (contato com superfície da embarcação, esgotes de canoas e
288 caixas do tipo monobloco), visto que seu habitat é o ambiente aquático, ou à
289 refrigeração inadequada e/ou uso de gelo em quantidade insuficiente e água sem
290 padrões de potabilidade adequados na fabricação do mesmo. Devido às características
291 psicrotróficas das bactérias do gênero *Aeromonas*, o armazenamento de pescado à
292 temperatura de refrigeração (4°C) não é um método seguro de inibição do crescimento
293 destes micro-organismos (VISENTINI, 2013).

294 Os dados corroboram com as informações de LOPES *et al.* (2012), que relataram
295 que 19 amostras (45,24%) de pescada amarela oriundas do município de Cedral - MA
296 estavam contaminadas por *A. hydrophila*, devido provavelmente ao contato inadequado
297 do alimento com pescadores portadores desta bactéria, visto que as espécies do gênero
298 *Aeromonas* podem estar associadas a várias infecções de pele.

299 A pescada amarela comercializada em São Luís - MA é oriunda da pesca
300 artesanal de vários municípios do litoral do Estado, como: Raposa, Cedral, Cururupu,
301 Humberto de Campos, São José de Ribamar, entre outros. Portanto, encontrar elevada
302 frequência de *Aeromonas* spp. nas amostras indica provavelmente a capacidade que
303 esta bactéria tem de suportar salinidade. Segundo VISENTINI (2013), estes resultados
304 podem explicar a distribuição de *Aeromonas* em águas marinhas e seu desenvolvimento
305 e manutenção em alimentos com NaCl como agente conservante.

306 Neste trabalho, mesmo que não tenha sido realizada a pesquisa de fatores de
307 virulência nos isolados de *A. hydrophila*, *A. veronii* biovar *veronii*, *A. caviae*, e *A.*
308 *schubertii*, é importante ressaltar o potencial patogênico descrito por ABBOTT *et al.*
309 (2003), tanto para o ser humano como para peixes, devido aos fatores de virulência
310 encontrados. De acordo com PEIXOTO *et al.* (2012), as espécies de *Aeromonas* spp.
311 secretam amilase, quitinase, gelatinase, lecitinase, elastase, aerolisina, nuclease, lipase e

312 protease. Estas proteínas são fatores de virulência que causam doenças em peixes e
313 humanos.

314 A ausência de *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*
315 representa um ponto positivo quanto à qualidade microbiológica das amostras
316 analisadas.

317 Boas práticas de conservação do pescado por meio da utilização de
318 gelo/refrigeração, e coletas de amostras no período de chuvas no Estado, podem ter
319 sido os fatores que contribuíram para a ausência de *Vibrio parahemolyticus*. As amostras
320 teriam sido influenciadas pelas baixas concentrações deste micro-organismo no
321 ambiente marinho neste período. ROSA *et al.* (2017) mostraram que mesmo sendo uma
322 espécie halofílica, *Vibrio parahemolyticus* não é facilmente encontrado em locais onde a
323 temperatura da água chega a valores inferiores a 15°C, havendo uma correlação entre a
324 presença da bactéria, a temperatura e a salinidade da água. O litoral maranhense, em
325 períodos mais chuvosos, tem sua temperatura e salinidade reduzidas, o que pode ter
326 interferido nas concentrações deste micro-organismo.

327 Na RDC nº 12 (BRASIL, 2001) não há valor de referência para *V.*
328 *parahaemolyticus* em peixes *in natura*; sendo estabelecidos limites apenas para pratos
329 prontos para o consumo, a base de pescados crus (10³ UFC/g). Porém, os dados
330 apresentados nesta pesquisa podem subsidiar revisões nas legislações com a
331 possibilidade de inclusão deste patógeno.

332 As amostras de pescada amarela não representam riscos de veicular *Salmonella*
333 spp. aos consumidores, o que o qualifica como dentro dos padrões da Resolução RDC
334 nº 12 (BRASIL, 2001), que determina ausência deste micro-organismo em 25 g de
335 pescado *in natura*. Resultados semelhantes quanto a ausência de *Salmonella* spp. na
336 presente pesquisa também foram verificados em outros estudos em peixes (SILVA *et al.*
337 2008, LOPES *et al.* 2012 e FERREIRA *et al.* 2014).

338 Quanto a *Listeria* sp., as amostras analisadas apresentam condições sanitárias
339 satisfatórias. A RDC nº 12 (BRASIL, 2001) não estabelece valor de referência para esta
340 bactéria em pescado, mas vale ressaltar que, segundo SILVA (2009), a presença de
341 *Listeria* sp. em pescado representa risco à saúde do consumidor, principalmente a
342 espécie *L. monocytogenes* que vem se destacando um dos mais importantes patógenos
343 veiculados por alimentos.

344 Os resultados deste estudo são semelhantes aos de SANTOS (2016) que, ao
345 analisar 60 amostras de tambaqui (*C. macropomum*) comercializados nas feiras e

346 supermercados de São Luís - MA, também não encontraram *Listeria* sp. em nenhuma
347 das amostras analisadas. É importante ressaltar, que tanto em peixes de água doce ou
348 marinha, é possível verificar a presença desta bactéria no alimento, pela sua
349 característica de ser facilmente encontrada na natureza. Ainda, a ausência desta
350 bactéria nas amostras analisadas, não descarta a possibilidade desses micro-
351 organismos estarem presentes em pescados ou produtos da pesca.

352

353 CONCLUSÕES

354 As amostras de pescada amarela não apresentaram contaminação por
355 *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo, *Listeria* sp. e *V. parahaemolyticus*,
356 entretanto, apresentaram coliformes a 35°C e a 45°C, *E. coli*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A.*
357 *veronii* biovar *veronii* e *A. schubertii*. Assim, as amostras apresentam condições
358 higiênico-sanitárias insatisfatórias. A presença de *E. coli* indica contaminação de
359 origem fecal.

360

361 AGRADECIMENTOS

362 À Universidade Estadual do Maranhão-UEMA, à Coordenação de
363 Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior-CAPES e a Fundação e Amparo à
364 Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão-FAPEMA.

365

366 REFERÊNCIAS

367 ABBOTT, S. L.; CHEUNG, W. K. W.; JANDA, J. M. 2003 The genus *Aeromonas*:
368 Biochemical characteristics. Atypical reactions and phenotypic identification schemes.
369 *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6): 2348-2357.

370 ALMEIDA, Z. da S.; ISAAC, V. J.; PAZ, A. C.; MORAIS, G. C.; PORTO, H. L. R. 2011
371 Avaliação do potencial de produção pesqueira do sistema da pescada-amarela
372 (*Cynoscion acoupa*) capturada pela frota comercial do Araçagi, Raposa, Maranhão.
373 *Boletim do Laboratório de Hidrobiologia*, 24(2): 35-42.

374 ALMEIDA, Z. da S.; SANTOS, N. B.; SOUSA, H. L. CARVALHO NETO, R. N. F.;
375 ANDRADE, T. de S. de O. 2016 Biologia reprodutiva da pescada amarela (*Cynoscion*
376 *acoupa*) capturada na baía de São Marcos, Maranhão, Brasil. *Biota Amazônica*, 6(1): 46-
377 54.

378 BALDIN, J. C. 2011 Avaliação da qualidade microbiológica do gelo utilizado na
379 conservação de pescado. São Paulo. 39f. (Dissertação de Mestrado. Universidade

380 Estadual Paulista). Disponível em:<
381 [https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/94606/baldin_jc_me_jabo.pdf?](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/94606/baldin_jc_me_jabo.pdf?sequence=1)
382 [sequence=1](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/94606/baldin_jc_me_jabo.pdf?sequence=1)>. Acesso em: 10 set. 2017.

383 BRASIL, 2001 RDC nº. 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões
384 microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*, 02 de Janeiro de 2001, nº 12,
385 Seção 1, 37p.

386 BRASIL, 2017 Secretaria de Vigilância em Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por
387 Alimentos no Brasil. Disponível em: <
388 [http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-](http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf)
389 [Surtos-DTA-2017.pdf](http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf)>. Acesso em: 19 ago. 2017.

390 BRASIL, 2003 INSTRUÇÃO NORMATIVA nº. 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os
391 Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para controle de Produtos
392 de Origem Animal e Água. *Diário Oficial da União*, 8 de dezembro de 1998, nº 574, Seção
393 4, 15p.

394 BRASIL, 2010 Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e
395 Aquicultura. Disponível em:
396 <[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf)
397 [Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf)>. Acesso em: 12 ago. 2016.

398 BRASIL, 2015 NORMA REGULAMENTADORA (NR 06) - Equipamento de Proteção
399 Individual. *Diário Oficial da União*, 16 abril 2015. nº 505, Seção 1, 8p.

400 BRASIL, 2016 Secretaria de Vigilância em Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por
401 Alimentos no Brasil. Disponível em: <
402 [http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-](http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf)
403 [Surtos-DTA-2016.pdf](http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf)>. Acesso em: 19 ago. 2017.

404 CARNAHAN, A. M.; BEHRAM, S.; JOSEPH, S.W. 1991 Aerokey II: a flexible key for
405 identifying clinical *Aeromonas* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(1): 2843-2849.

406 CUNHA, M. L. R. S; PERESI, E; CALSOLARI, R. A. O; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. 2006
407 Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from
408 foods. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(1):70-4.

409 FERREIRA, E. M.; LOPES, I. da S.; PEREIRA, D. DE M.; RODRIGUES, L. da C.;
410 COSTA, F. N. 2014 Qualidade microbiológica do peixe serra (*Scomberomerus*
411 *brasiliensis*) e do gelo utilizado na sua conservação. *Arquivos do Instituto Biológico*, 81(1):
412 49-54.

- 413 FISH BASE. 2017 *Cynoscion acoupa*. Disponível em: <
414 <http://www.fishbase.org/summary/1169>>. Acesso em: 01 set. 2017.
- 415 FREITAS, L. C. S. 2014 *Salubridade ambiental e a feira livre do bairro vila nova república em*
416 *São Luís – MA*. Disponível em: <<http://www2.fct.unesp.br>>. Acesso em: 01 dez. 2017.
- 417 GONÇALVES, A. A. 2011 *Tecnologia de pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação*.
418 São Paulo: Editora Atheneu. 624p.
- 419 LAMAITA, H.C. 2003 *Frequência de espécies de Staphylococcus, de TSST-1 e de*
420 *enterotoxinas estafilocócicas em leite cru refrigerado em propriedades de Minas Gerais*. Minas
421 Gerais. 2003. 74f. (Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais).
422 Disponível em: <[http://www.sidalc.net/cgi-](http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=AGB.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=211579)
423 [bin/wxis.exe/?IsisScript=AGB.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion](http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=AGB.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=211579)
424 [=mfn=211579](http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=AGB.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=211579)>. Acesso em: 10 set. 2017.
- 425 LOPES, I. S., FERREIRA, E. M., PEREIRA, D. M., PEREIRA, L. S., CUNHA, M. C. S.,
426 COSTA, F. N. 2012 *Pescada amarela (Cynoscion acoupa) desembarcada: características*
427 *microbiológicas e qualidade do gelo utilizado na sua conservação*. *Revista Instituto*
428 *Adolfo Lutz*, 71(4):77-84.
- 429 MASSARO, R. M. G.; YURI, T. R. 2016 *Pescado é saúde: uso do frio*. São Paulo:
430 Coordenadoria de Desenvolvimento dos Agronegócios. 40p.
- 431 PEIXOTO, L.J.S.; SÁ, M.C.A. Sá; GORDIANO, L.A.; COSTA, M.M. 2012 *Aeromonas*
432 *spp.: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados*.
433 *Arquivo do Instituto de Biologia*, 79(3): 453-461.
- 434 PEREIRA, T. de J. F.; FERREIRA, L. K. S.; EVERTON, F. A.; FRAZÃO, F. B.; LIMA, M.
435 de F. V. 2010 *Comercialização de pescado no Portinho em São Luís, Estado do*
436 *Maranhão, Brasil: uma abordagem socioeconômica dos trabalhadores*. *Revista Brasileira*
437 *de Engenharia de Pesca*, 5(3): 1-8.
- 438 PESCATUR. 2016 *Pescada amarela*. Disponível em:
439 <<http://www.pesca.tur.br/peixes/agua-salgada/pescada-amarela/>>. Acesso em: 26
440 maio 2016.
- 441 ROSA, J. V. da; KAEFER, K.; CONCEIÇÃO, N. V. da; CONCEIÇÃO, R. C. S da.; TIMM,
442 C. D. 2017 *Formação de biofilme por Vibrio parahaemolyticus isolados de pescados*.
443 *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(4): 339-345.
- 444 SANTOS, E. J. R. 2016 *Avaliação microbiológica e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos*
445 *das bactérias isoladas de tambaqui (Colossoma macropomum) comercializado na cidade de São*
446 *Luís – MA*. São Luis. 61f. (Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do

- 447 Maranhão). Disponível em:
448 <[http://www.cienciaanimal.uema.br/index.php?option=com_content&view=article&](http://www.cienciaanimal.uema.br/index.php?option=com_content&view=article&id=287%3Adissertacoes&Itemid=229)
449 [id=287%3Adissertacoes&Itemid=229](http://www.cienciaanimal.uema.br/index.php?option=com_content&view=article&id=287%3Adissertacoes&Itemid=229)>. Acesso em: 20 abr. 2017.
- 450 SILVA, F. M. da. 2009 *Listeria monocytogenes: um perigo invisível nos alimentos*. São Paulo.
451 44f. (Monografia do Curso de Medicina Veterinária. Faculdades Metropolitanas
452 Unidas). Disponível em: <<http://arquivo.fmu.br/prodisc/medvet/fms.pdf>>. Acesso
453 em: 10 set. 2017.
- 454 SILVA, M.L.; MATTÉ, G.R.; MATTÉ, M.H. 2008 Aspectos sanitários da comercialização
455 de pescado em feiras livres da cidade de São Paulo, SP/Brasil. *Revista do Instituto Adolfo*
456 *Lutz*, 67(3): 208-214.
- 457 SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. de A; TANIWAKI, M. H.;
458 SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R. A. R. 2007 *Manual de métodos de análise microbiológica*
459 *de alimentos*. 3ª ed. São Paulo: Varela. 536 p.
- 460 SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A. 2012 Qualidade e segurança do pescado.
461 *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 71(1): 1-10.
- 462 SOARES, V. M.; PEREIRA, J. G.; IZIDOROA, T. B.; MARTINSA, O. A.; PINTO, J. P. DE
463 A. N.; BIONDIA, G. F. 2011 Qualidade Microbiológica de Filés de Peixe Congelados
464 Distribuídos na Cidade de Botucatu - SP. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da*
465 *Saúde*, 13(2):85-8.
- 466 STATSOFT, INC. 2004 Programa computacional Statistica 7.0. E.A.U.
- 467 VISENTINI, E. O. dos S. 2013 *Tolerância de Aeromonas spp. ao estresse salino*. Caxias do
468 Sul. 54 f. (Dissertação de Mestrado. Universidade de Caxias do Sul). Disponível em: <
469 <https://repositorio.ucs.br/xmlui/bitstream/handle/11338/680/Dissertacao%20Evanise%20Visentini.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 07 nov. 2017.

CAPÍTULO III

Artigo submetido à Pesquisa Veterinária Brasileira
(Identificação do manuscrito PVB 5752)
(Qualis A2)

1 **Perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *Aeromonas* spp. e *Escherichia coli* isoladas de**
2 **pescada amarela (*Cynoscion acoupa*)¹**
3

4 Fabiana B. Frazão², Lygia S. Galeno², Hortência Regina M. do Nunes², Thaliane F. Costa², Priscila A.
5 Beserra², Luciana da S. Bastos², Isabel A. Carvalho² e Francisca N. Costa^{2*}
6
7

8 **ABSTRACT.-** Frazão F. B, Galeno L. S., Nunes H. R. M., Costa T. F., Beserra P. A., Bastos L. da S.,
9 Carvalho I. A. & Costa F. N. 2017. [**Antimicrobial susceptibility profile of *Aeromonas* spp. and**
10 ***Escherichia coli* isolated of yellow fish (*Cynoscion acoupa*)**] Perfil de suscetibilidade
11 antimicrobiana de *Aeromonas* spp. e *Escherichia coli* isoladas de pescada amarela (*Cynoscion*
12 *acoupa*). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Microbiologia de Alimentos e
13 Água, Universidade Estadual do Maranhão-UEMA, CEP: 65055-310, Brasil. E-mail:
14 francisca.cca.uema@gmail.com

15 The aim of this study was to evaluate the antimicrobial susceptibility profile of
16 *Aeromonas* spp. and *Escherichia coli* isolated from samples of yellow hake (*Cynoscion acoupa*). We
17 analyzed 53 isolates of *Aeromonas* spp. and four isolates of *Escherichia coli*. The in vitro
18 antimicrobial susceptibility tests were performed by disk-diffusion, according to Clinical and
19 Laboratory Standards Institute (CLSI). The selection of eleven antimicrobials was based on the
20 most used antimicrobials in the human and veterinary clinic. Increased resistance of *E. coli* to
21 levofloxacin and sulfa-trimethoprim was observed; as well as antimicrobial resistance of
22 *Aeromonas* spp. ampicillin, amoxicillin-clavulanate, cefuroxime and cefotaxime. The values found
23 for the MAR index, evidenced multiresistance in 90.54% (n = 48) of the *Aeromonas* spp. and 50% (n
24 = 2) of the *E. coli* isolates. A strain of *Aeromonas* spp. presented resistance to all eleven
25 antimicrobials tested (MAR = 1.00). Research has shown that, in the treatment of infections caused
26 by *E. coli*, piperacillin-tazobactam is most effective in vitro. For *Aeromonas* spp., the most effective
27 antimicrobials in vitro were cefepime and levofloxacin. Thus, in case of diseases caused by this
28 microorganism, these would be the antimicrobial of choice for the treatment of infections. The
29 multiresistance of *Aeromonas* spp. and *E. coli* was considered elevated. This is an important data
30 since the increase of the appearance of bacteria resistant to multiple drugs is worrisome,
31 diminishing the options of use of antimicrobial with clinical success.
32

33 INDEX TERMS: antibiogram, fish, trade, multiresistance.
34

35 ¹Recebido em.....

36 Aceito para publicação.....

37 ² Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água, curso de Medicina Veterinária, Universidade
38 Estadual do Maranhão-UEMA, CEP: 65055-310, Brasil. *Autor para correspondência:
39 francisca.cca.uema@gmail.com
40
41

42 **RESUMO.-** O trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de
43 bactérias do gênero *Aeromonas* spp. e *Escherichia coli* isoladas de amostras de pescada amarela
44 (*Cynoscion acoupa*). Foram analisados 53 isolados de *Aeromonas* spp. e quatro isolados de
45 *Escherichia coli*. Os testes suscetibilidade *in vitro* aos antimicrobianos foram realizados por disco-
46 difusão, de acordo com Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). A seleção dos onze
47 antimicrobianos se deu com base nos antimicrobianos mais utilizados na clínica humana e
48 veterinária. Foi verificada maior resistência de *E. coli* à levofloxacina e sulfa-trimetoprim; assim
49 como houve resistência antimicrobiana dos isolados de *Aeromonas* spp. à ampicilina, amoxicilina-
50 clavulanato, cefuroxima e cefotaxima. Os valores encontrados para o índice MAR, evidenciam
51 multirresistência em 90,54% (n=48) dos isolados de *Aeromonas* spp. e em 50% (n=2) dos isolados
52 de *E. coli*. Uma cepa de *Aeromonas* spp. apresentou resistência a todos os onze antimicrobianos
53 testados (MAR = 1,00). A pesquisa mostrou que, no tratamento de infecções causadas por *E. coli*, a
54 piperacilina-tazobactam é a mais eficaz *in vitro*. Para *Aeromonas* spp., os antimicrobianos mais
55 eficazes *in vitro* foram cefepime e levofloxacina. Dessa forma, em caso de enfermidades ocasionadas
56 por esse micro-organismo, seriam esses os antimicrobianos de eleição para o tratamento das
57 infecções. A multirresistência dos isolados de *Aeromonas* spp. e *E. coli* foi considerada elevada. Este
58 é um dado importante visto que o aumento do aparecimento de bactérias resistentes a múltiplas
59 drogas é preocupante, diminuindo as opções de uso de antimicrobianos com sucesso clínico.

60
61
62 Os antimicrobianos testados foram estes: ampicilina 10µg – AMP, amicacina 30 µg - AMI, amoxicilina-
63 clavulanato 20/10 µg - AMC, cefepime 30 µg - CPM, cefoxitina 30 µg - CFO, cefotaxima 30 µg - CTX,
64 cefuroxima 30 µg - CRX, levofloxacina 5 µg - LVX, gentamicina 120 µg – GEN, piperacilina 100 µg –
65 PPT e sulfa-trimetoprim 25 µg – SUT.

66
67 TERMOS DE INDEXAÇÃO: antibiograma, peixe, comércio, multirresistência.
68
69
70

71 INTRODUÇÃO

72 A pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) é uma espécie de peixe marinho com grande
73 distribuição geográfica em todas as regiões do litoral brasileiro (Pescatur 2016). No Maranhão, a
74 pescada amarela representa 10% da produção pesqueira. Tem grande valor comercial não apenas
75 sua carne, mas também sua bexiga natatória, sendo bem valorizada até mesmo no mercado
76 internacional (Araújo 2008; Tribuna Amapaense 2014; Almeida et al. 2016).

77 A demanda por esse pescado causa uma preocupação relacionada à qualidade com que
78 deve ser ofertado ao consumidor nos locais de venda, como em mercados e feiras livres (Machado
79 et al. 2015).

80 Os peixes constituem-se veiculador potencial de micro-organismos patogênicos para o ser
81 humano, tais como: *Staphylococcus* coagulase positivo, coliformes, *Vibrio parahaemolyticus*, *E. coli*,
82 *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Aeromonas* spp., entre outros. A presença desses micro-organismos
83 demonstra falhas desde a obtenção de peixe *in natura* até a conservação do produto final, que
84 comprometem a qualidade e o grau de frescor, podendo levar a doenças transmitidas por alimentos
85 - DTA's (Vieira et al. 2006; Ribeiro 2009; Soares 2012).

86 No alimento, para que venha ocorrer uma DTA o patógeno ou sua toxina devem estar
87 presentes (VSSC 2017). Dessa forma, a contaminação pode estar relacionada tanto pela presença de
88 micro-organismos deteriorantes, quanto patogênicos com perfil de resistência a diferentes
89 antimicrobianos (Machado et al. 2015). Torna-se preocupante a ocorrência de bactérias com perfil
90 de suscetibilidade resistente frente aos antimicrobianos. Visto que, ao longo dos anos, a resistência
91 de bactérias a antimicrobianos vem crescendo, devido principalmente ao uso indiscriminado dessas
92 drogas.

93 Diversos métodos laboratoriais podem ser usados para determinar a sensibilidade *in vitro*
94 de bactérias aos agentes antimicrobianos, podendo ser citados os testes de difusão em discos
95 (NCCLS 2003). É um dos métodos de suscetibilidade mais simples, confiável e mais utilizado pelos
96 laboratórios de microbiologia. Por este método se determina a leitura dos diâmetros das zonas de
97 inibição, que são mensurados com régua e interpretados de acordo com a tabela padrão para testes
98 de suscetibilidade a antimicrobianos e classificados como resistentes, intermediários ou sensíveis
99 (ANVISA 2008).

100 Diante do exposto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar o perfil de suscetibilidade à
101 antimicrobianos de *Aeromonas* sp. e *Escherichia coli* isoladas de amostras de pescada amarela
102 (*Cynoscion acoupa*) comercializadas na cidade de São Luís-MA.

103 MATERIAL E MÉTODOS

104
105 Foi analisado o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de 53 isolados de *Aeromonas*
106 spp. e quatro de *Escherichia coli* isoladas de amostras de pescada amarela comercializadas em São
107 Luís - MA, em Março de 2017, de acordo com a metodologia da *American Public Health Association*
108 (APHA)(Vanderzant & Splitt-Stoesser 1992).

109 Os testes suscetibilidade *in vitro* aos antimicrobianos foram realizados por disco-difusão,
110 de acordo com Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Os antimicrobianos testados
111 foram estes: ampicilina 10µg – AMP, amicacina 30 µg - AMI, amoxicilina-clavulanato 20/10 µg - AMC,
112 cefepime 30 µg - CPM, cefoxitina 30 µg - CFO, cefotaxima 30 µg - CTX, cefuroxima 30 µg - CRX,
113 levofloxacina 5 µg - LVX, gentamicina 120 µg – GEN, piperacilina 100 µg – PPT e sulfa-trimetoprim
114 25 µg – SUT. A seleção destes antimicrobianos se deu com base nos antimicrobianos mais utilizados
115 na clínica humana e veterinária. Utilizaram-se os resultados interpretativos resistente, resistência
116 intermediária ou sensível (Anvisa 2008).

117 O índice MAR (múltipla resistência a antimicrobianos) foi calculado como sendo a razão de
118 a/b, onde “a” é o número de antimicrobianos a que o isolado foi resistente e “b” número de

119 antimicrobianos a que o isolado foi exposto. Valores >0,17 indicam multirresistência (Krumperman
120 1983).

122 RESULTADOS

123 O perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de isolados de *E. coli* está demonstrado no
124 Quadro 1.

125 De modo geral, os isolados de *E. coli* apresentaram resistência a nove dos 11
126 antimicrobianos testados. Notou-se a maior resistência dos isolados à levofloxacina (50%) e à sulfa
127 trimetoprim (50%).

128 Os isolados de *E. coli* mostraram sensibilidade a dez dos 11 antimicrobianos testados,
129 sendo a piperacilina-tazobactam, 100% eficaz. Além disso, os isolados mostraram resistência
130 intermediária a seis dos antimicrobianos testados.

131 Conforme o Quadro 2, observou-se a resistência antimicrobiana dos isolados de *Aeromonas*
132 spp. Além da resistência de 92,45% dos isolados à ampicilina, foi observada com maiores
133 porcentagens a resistência à amoxicilina-clavulanato (64,15%), cefuroxima (81,13%) e cefotaxima
134 (52,83%). Cefepime e levofloxacina foram os antimicrobianos mais eficientes (75,47%, ambos).

135 Os valores encontrados para o índice de múltipla resistência a antimicrobianos (MAR), de
136 acordo com o Quadro 3, apresentam-se com variação de 0,18 a 1,00 nos isolados de *Aeromonas* spp.
137 e *E. coli*, e evidenciam a multirresistência de 90,54% (n=48) dos isolados de *Aeromonas* spp. e de
138 50% (n=2) dos isolados de *E. coli*. Um isolado de *Aeromonas* spp. apresentou-se resistente a todos
139 os onze antimicrobianos testados (MAR = 1,00).

141 DISCUSSÃO

142 Os isolados de *E. coli* mostraram sensibilidade para piperacilina-tazobactam, cefepime,
143 cefoxitina e cefotaxima, sendo estes antimicrobianos adequados para tratamento de infecções
144 provocadas por *E. coli*. A piperacilina-tazobactam foi a mais eficaz. Semelhante aos dados
145 encontrados, Cordeiro (2017), ao avaliar a suscetibilidade antimicrobiana de *E. coli* isolada de
146 *sashimi* de salmão (*Salmo salar*), observou que todos os isolados foram sensíveis aos
147 antimicrobianos cefepime, cefotaxima, levofloxacina, piperacilina-tazobactam e sulfa-trimetoprim.

148 Segundo Melo et al. (2012), a piperacilina-tazobactam exerce a atividade bactericida pela
149 inibição do septo e síntese da parede celular, sendo, portanto, indicada nos tratamentos causados
150 por infecções urinárias, peritonite, síndrome urêmica hemolítica e gastroenterite nos seres
151 humanos causadas por *E. coli*.

152 Nos estudos de Cordeiro (2016), também foram observados isolados de *E. coli* resistentes à
153 sulfa-trimetoprim. O uso abusivo de antimicrobianos (Cardoso et al. 2015), contribui para
154 aumentar a resistência bacteriana.

155 Nesse caso, a condição de resistência dos isolados de *E. coli* à sulfa-trimetoprim pode estar
156 associada com a capacidade de persistência deste antimicrobiano no ambiente aquático e/ou pelo
157 fato do mesmo estar sendo utilizado indiscriminadamente no país.

158 Semelhante aos resultados encontrados nesse estudo, Dias et al. (2010); Machado et al.
159 (2015) encontraram resistência antimicrobiana à ampicilina em *E. coli* isolada de pargo, cavala e
160 mexilhões. A resistência antimicrobiana à ampicilina em isolados de *E. coli* em pescada amarela,
161 provavelmente é explicada pelo fato de a resistência à ampicilina ser genética (origem
162 cromossômica ou plasmidial). Lima et al. (2006) afirmam que caso essa resistência seja codificada
163 por plasmídios estes podem disseminar esta característica para espécies bacterianas
164 filogeneticamente distintas, patogênicas ou não.

165 De acordo com Peixoto (2012), as informações de resistência a antimicrobianos em
166 bactérias oriundas de alimentos são fundamentais para indicar uma droga que seja eficiente no
167 tratamento de pacientes infectados por bactérias. Dentre o gênero *Aeromonas* spp., *A. hydrophila*
168 um importante patógeno para peixes e de importância a saúde pública, pois desenvolvem-se sob
169 temperatura de refrigeração e produzem exotoxinas.

170 Cefepime e levofloxacina foram os antimicrobianos mais eficientes, sendo adequados para
171 tratamento de infecções provocadas por *Aeromonas* spp., enquanto ampicilina, amoxicilina-
172 clavulanato, cefuroxima e cefotaxima, por terem sido os antimicrobianos menos eficazes não devem
173 ser indicados para o tratamento de doenças ocasionadas por *Aeromonas* spp.

174 Segundo a Anvisa (2017), a resistência intermediária permite a utilização do
175 antimicrobiano para o tratamento de infecções onde o antimicrobiano atinge concentrações
176 adequadas, podendo ser utilizado nas situações em que não há contra-indicação para o uso de doses
177 mais elevadas.

A resistência dos isolados de *E. coli* e *Aeromonas* spp. pode ser explicada pelo uso indiscriminado de antimicrobianos em alimentos e/ou cultivos aquícolas (pisciculturas e carciniculturas), e que por sua vez pode chegar ao ambiente aquático marinho. A resistência pode variar de acordo com alguns parâmetros, conforme Machado et al. (2015): proximidade com áreas que adotam o uso de antimicrobianos (criações de peixes ou esgotos hospitalares liberados em zonas costeiras e estuários), período chuvoso e água poluídas com esgotos industriais.

A diferença no perfil de resistência pode ser justificada também pelas características do *habitat* em que a pescada se encontra e pela frequência com que seja encontrada e capturada em tais ambientes. A pescada amarela comercializada em São Luís - MA é oriunda de vários municípios do litoral do Estado, como: Raposa, Cedral, Cururupu, Humberto de Campos, São José de Ribamar, entre outros. Almeida et al. (2016) afirmam que a pescada amarela é uma espécie demersal (vive a maior parte do tempo em substratos arenosos, lodosos e rochosos) e pelágica (nada livremente na coluna d'água). Apresenta hábito costeiro podendo ser capturada em regiões de manguezais ou regiões com profundidade que variam de 1 a 35 m. Dessa forma, a espécie pode ter tido contato com resíduos de drogas no meio ambiente marinho.

O índice MAR também foi analisado por Evangelista-Barreto et al. (2010), em *A. caviae*, *A. sobria* e *A. veronii*. *A. caviae* apresentou o maior índice, sendo resistente a quatro antimicrobianos em relação aos oito testados.

Hirsch et al. (2006) também analisaram o índice MAR em *Aeromonas* spp. isolados de tilápia e afirmaram que o estudo de isolados multirresistentes é importante, visto que estes micro-organismos podem ser veiculados por alimentos contaminados, e há a possibilidade de transferência de genes de resistência à microbiota intestinal dos consumidores.

Bactérias em geral possuem sistemas biológicos que permitem a troca/compartilhamento de genes resistentes a antibacterianos entre os micro-organismos que se tornam resistentes ou multirresistentes, podendo causar doenças de difícil tratamento em seres humanos (Leal et al. 2017). A gastroenterite é a forma de infecção humana mais comum causada por *Aeromonas* spp. Porém, septicemia, síndrome urêmica hemolítica, peritonite, feridas, infecções respiratórias e pústulas cutâneas são outras formas comuns de sinais clínicos. Já, nos peixes, a doença pode causar exoftalmia, erosão de nadadeiras, septicemia hemorrágica, podendo levar até a morte do animal (Figueiredo et al., 2017).

Machado et al. (2015), analisando multirresistência em isolados de *E. coli* de pargo e cavala comercializados em Fortaleza - CE, observaram que 68,7% dos isolados apresentavam perfil de multirresistência. Os autores associaram os resultados à constante manipulação de outros peixes e ao contato com vários utensílios no mesmo ambiente (contaminação cruzada), contribuindo na transferência de bactérias multirresistentes entre os peixes manuseados.

CONCLUSÕES

Constatou-se resistência de isolados de *Aeromonas* spp. e *E. coli* a diferentes antimicrobianos, principalmente à ampicilina. Os isolados de *E. coli* mostrou-se mais sensíveis a piperacilina-tazobactam, sendo este antimicrobiano mais adequado para tratamento de infecções provocadas por essa bactéria. Os isolados de *Aeromonas* spp. apresentaram-se mais sensíveis às drogas cefepime e levofloxacina, sendo estes os antimicrobianos de eleição para o tratamento de infecções por *Aeromonas* spp. Foi observada elevada multirresistência dos isolados, o que é um dado importante, visto que o aumento do aparecimento de bactérias resistentes a múltiplas drogas é preocupante, diminuindo as opções de uso de antimicrobianos com sucesso clínico.

REFERÊNCIAS

- Almeida Z. da S., Santos N. B., Sousa H. L., Carvalho Neto R. N. F. & Andrade T. de S. de O. 2016. Biologia reprodutiva da pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) capturada na baía de São Marcos, Maranhão, Brasil. *Biot. Amaz.* 6(1): 46-54.
- ANVISA 2008. Interpretação de dados microbiológicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos>. Acesso em: 07 dez. 2017.
- Araújo C. M. E. 2008. Fauna acompanhante do Sistema de Produção Pesqueira Pescada Amarela (*Cynoscion acoupa*, PISCES: SCIANIDAE, LACEPÉDE 1802) desembarcada na praia do Araçagy, área do litoral da Ilha do Maranhão, Brasil: subsídios para sua conservação. Dissertação de Mestrado. Disponível em http://www.academia.edu/9506416/Fauna_acompanhante_do_Sistema_de_Produ%C3%A7%C3%A3o_de_Pescada_Amarela

- 236 3%A3o_Pesqueiro_Pescada_Amarela_Cynoscion_acoupa_-
237 _PISCES_SCIANIDAE_LACEP%C3%89DE_1802_subs%C3%ADdios_para_sua_conserva%C3%A7
238 %C3%A3o Acesso em 15 jun. 2017.
- 239 Belém-Costa A. & Cyrino J.E.P. 2006. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from
240 *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Scient.*
241 *Agric.* 36(3): 281-284.
- 242 Brasil 2017. Resolução nº2.303, de 25 de agosto de 2017 da Diretoria de Controle e Monitoramento
243 Sanitários do Ministério da Saúde. Disponível em
244 <[http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=47&data=30/0](http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=47&data=30/08/2017)
245 [8/2017](http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=47&data=30/08/2017)> Acesso em 28 out. 2017.
- 246 Cardoso A. L. S. P., Kanashiro A. M. I., Stoppa G. F. Z., Castro A. G. M. de., Luciano R. L. & Tessarilo E.
247 N. C. 2015. Avaliação do perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isolada de aves
248 comerciais. *Rev. Eletr. Nutr.* 12(5): 4216-4222.
- 249 CLSI 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-Fifth
250 Informational Supplement. Disponível em
251 <<https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?>> Acesso em 14 jul. 2017.
- 252 Cordeiro K. S. 2017. Micro-organismos indicadores e patogênicos, susceptibilidade à
253 antimicrobianos e histamina em sashimi de salmão (*Salmo salar*). Dissertação de Mestrado.
254 Disponível em <<http://www.cienciaanimal.uema.br/images/diss/diss-2017/karina.pdf>> Acesso
255 em: 14 jul. 2017.
- 256 Costa F. R. L., Peixoto, R. M., Sá M., Krewer C., Maboni F. & Costa Mm. 2008. Isolamento e perfil de
257 sensibilidade aos antimicrobianos de amostras de *Escherichia coli* obtidas de carne
258 comercializada no município de Petrolina, PE. Disponível em
259 <<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0179-2.pdf>> Acesso em 17
260 jul. 2017.
- 261 Dias M. T, Santos P. C. R. F., Oliveira L. A. T. & Marin V. A. 2010. Avaliação da sensibilidade de cepas
262 de *Escherichia coli* isoladas de mexilhões (*Perna perna* LINNAEUS, 1758) à antimicrobianos. *Soc.*
263 *Bras. Ciênc. Tecn. Alim.* 30(2): 319-324.
- 264 Evangelista-Barreto N.S., Carvalho F. C. T., Vieira R. H. S. F., Reis C. M. F., Macrae A. & Rodrigues D. P.
265 2010. Characterization of *Aeromonas* species isolated from na estuarine environment. *Braz. J.*
266 *Microb.* 41(2):452-460.
- 267 Figueiredo H. C. P., Castro G. dos A. de C., Leal C. A. G. & Lopes C. O. L. 2017. Sanidade aquícola. Quem
268 tem medo de *Aeromonas*? Disponível em
269 <<http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/Revistas/108/Sanidade108.asp>> Acesso
270 em 25 nov. 2017.
- 271 FUNDECI 2009. Potencial cearense para a piscicultura marinha. Disponível em
272 <[http://www.agenciaprodetec.com.br/estudos-e-pesquisas/108-potencial-cearense-para-](http://www.agenciaprodetec.com.br/estudos-e-pesquisas/108-potencial-cearense-para-piscicultura-marinha.html)
273 [piscicultura-marinha.html](http://www.agenciaprodetec.com.br/estudos-e-pesquisas/108-potencial-cearense-para-piscicultura-marinha.html)>. Acesso em 26 jul. 2017.
- 274 Gastalho S., Silva G.J. da & Ramos F. 2014. Uso de antibióticos em aquicultura e resistência
275 bacteriana: Impacto em saúde pública. *Acta Farm. Port.* 3(1): 29-45.
- 276 Hirsch D., Pereira Junior D. J., Logato P. V. R., Piccoli R. H. & Figueiredo, H. C. P. 2006. Identificação e
277 resistência a antimicrobianos de espécies *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambientes
278 aquáticos. *Ciênc. Agrotec.* 30(6): 1211-1217.
- 279 Krumperman P. H. 1983. Multiple Antibiotic Resistance Indexing of *Escherichia coli* to Identify
280 High-Risk Sources of Fecal Contamination of Foods. *Applied. Environm. Microb.* 46(1): 165-170.
- 281 Kumar H.S., Parvathi A. & Karunasagar, I. 2005. Prevalence and antibiotic resistance of *Escherichia*
282 *coli* in tropical seafood. *World J. Microb. Biot.* 21(5): 619-623.
- 283 Leal C. A. G., Oliveira T. F. & Figueiredo H. C. P. 2017. Antibacterianos na piscicultura: erros, acertos
284 e riscos. *Rev. Pan. Aquic.* 27(162):14-23.
- 285 Lima R. M. S., Figueiredo H. C. P., Faria F. C. de, Piccoli R. H., Bueno Filho J. S. de. & Logato P. V. R.
286 2006. Resistência a antimicrobianos de bactérias oriundas de ambiente de criação e filés de
287 tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*). *Ciênc. Agrotec.* 30(1):126-132.
- 288 Machado A. L., Araújo R. L., Sousa O. V. de. & Vieira R. H. S. dos F. 2015 Resistência antimicrobiana
289 em cepas de *Escherichia coli* isoladas de pescado marinho comercializado na feira livre do
290 Mucuripe - Fortaleza-CE, Brasil. *Bol. Inst. Pesc.* 41(4): 931 - 943.
- 291 Melo V. V., Duarte I. de P. & Soares A. Q. 2012. Guia Antimicrobianos. Disponível em
292 <https://farmacia.hc.ufg.br/up/734/o/Guia_de_Antimicrobianos_do_HC-UFG.pdf?1409055717>
293 Acesso em 25 ago. 2017.

- 294 NCCLS 2003. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved
295 Standard. 8rd ed. NCCLS document: Pennsylvania. 58p. Disponível em
296 <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf> Acesso em 17
297 maio 2017.
- 298 Peixoto L. J. S., Sá M. C. A., Gordiano L. A. & Costa M. M. 2012. *Aeromonas* spp.: fatores de virulência e
299 perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. Arq. Inst. Biol. 79(3): 453-461.
- 300 Ribeiro A. L. M. Dos S., Oliveira G. M. De, Ferreira V. De M., Pereira M. M. D. & Silva P. P. O. 2009.
301 Avaliação microbiológica da qualidade do pescado processado, importado no estado do Rio de
302 Janeiro. Rev. Bras. Ciênc. Vet. 16(3): 109-112.
- 303 Soares K. M. P. & Gonçalves A. A. 2012. Qualidade e segurança do pescado. Rev. Inst. Adolfo Lutz,
304 71(1): 1-10.
- 305 Vanderzant C. & Splitt-Stoesser D. F. 1992. Compendium of Methods for the microbiological.
306 Examination of food, American Public Health Association. APHA: Washington D.C.
- 307 Vieira R. H. S. dos F., Rebouças R. H. & Albuquerque W. F. 2006. *Staphylococcus* coagulase positiva
308 em camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri*, comercializado na feira-livre de pescado do
309 Mucuripe – Fortaleza – CE. Bol. Técn. Cient. CEPENE. 14(1): 11-22.
- 310 VSSC 2017. Vigilância Sanitária de Santa Catarina. Doenças transmitidas por alimentos. Disponível
311 em: <<http://www.vigilanciasanitaria.sc.gov.br/index.php/inspecao-de-produtos-e-servicos-de-saude/alimentos/91-area-de-atuacao/inspecao-de-produtos-e-servicos-de-saude/alimentos/415-doenca-transmitida-por-alimento-dta>>. Acesso em: 07 dez. 2017.

314
315
316
317

318 **Legenda dos Quadros**

- 319 **Quadro 1.** Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de isolados de *Escherichia coli* oriundos de
320 amostras de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializada na cidade de São Luís – MA, 2017.
321
- 322 **Quadro 2.** Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de isolados de *Aeromonas* spp. oriundos de
323 amostras de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializada na cidade de São Luís – MA, 2017.
324
- 325 **Quadro 3.** Índice de Múltipla Resistência aos Antimicrobianos (MAR) de isolados de *Aeromonas*
326 spp. e *Escherichia coli* oriundos de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*), 2017.

Quadro 1.

Antimicrobianos	Número de isolados (N)			Total
	Resistente	Intermediário	Sensível	
Ampicilina	1 (25%)	3 (75%)	0	4
Amicacina	1 (25%)	1 (25%)	2 (50%)	4
Amoxicilina - Clavulanato	1 (25%)	1 (25%)	2 (50%)	4
Gentamicina	1 (25%)	1 (25%)	2 (50%)	4
Cefuroxima	1 (25%)	1 (25%)	2 (50%)	4
Cefepime	0	1(25%)	3 (75%)	4
Cefoxitina	1 (25%)	0	3 (75%)	4
Cefotaxima	1 (25%)	0	3 (75%)	4
Levofloxacina	2 (50%)	0	2 (50%)	4
Piperacilina - Tazobactam	0	0	4 (100%)	4
Sulfa - Trimetoprim	2 (50%)	0	2 (50%)	4

N (%): Número de bactérias que apresentam resistência ao "n" de antimicrobianos e respectiva porcentagem

Quadro 2.

Antimicrobianos	Número de isolados (N)			Total
	Resistente	Intermediário	Sensível	
Ampicilina	49 (92,45%)	1 (1,89%)	3 (5,66%)	53
Amicacina	17 (32,08%)	1 (1,89%)	35 (66,04%)	53
Amoxicilina - Clavulanato	34 (64,15%)	6 (11,32%)	13 (24,53%)	53
Gentamicina	13 (24,53%)	3 (5,66%)	37 (69,81%)	53
Cefuroxima	43 (81,13%)	1 (1,89%)	9 (16,98%)	53
Cefepime	12 (22,64%)	1 (1,89%)	40 (75,47%)	53
Cefoxitina	25 (47,17%)	3 (5,66%)	25 (47,17%)	53
Cefotaxima	28 (52,83%)	4 (7,55%)	21 (39,62%)	53
Levofloxacina	5 (9,43%)	8 (15,09%)	40 (75,47%)	53
Piperacilina-tazobactam	10 (18,87%)	8 (15,09%)	35 (66,04%)	53
Sulfa Trimetoprim	14(26,42%)	7 (13,21%)	32 (60,38%)	53

N (%): Número de bactérias que apresentam resistência ao "n" de antimicrobianos e respectiva porcentagem.

Quadro 3.

Isolados multirresistentes	Antimicrobianos (n)									
	N (%)	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Aeromonas</i> sp. (48)	13 (24,52)	13 (24,52)	3 (5,66)	2 (3,77)	2 (3,77)	1 (1,89)	7 (13,20)	1 (1,89)	5 (9,43)	1 (1,89)
<i>E. coli</i> (2)	1 (25)	-	-	-	-	-	1 (25)	-	-	-
Índice MAR	0,18	0,27	0,36	0,45	0,54	0,63	0,73	0,81	0,91	1,00

n: Número de antimicrobianos, N (%): Número de bactérias que apresentam resistência ao "n" de antimicrobianos e respectiva porcentagem.

ANEXOS 