

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE PEIXES E FRUTOS DO MAR
COMERCIALIZADOS EM BOTUCATU, SP.**

Botucatu
Dezembro de 2013

LUHAN EDUARDO CARMELLO

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE PEIXES E FRUTOS DO MAR
COMERCIALIZADOS EM BOTUCATU, SP.

Trabalho de conclusão de curso apresentado à diretoria da Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) como requisito para obtenção do título de Bacharel no curso de Ciências Biológicas, sob coordenação da Prof^a Dr^a Vera Lúcia Mores Rall

BOTUCATU
DEZEMBRO DE 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Caramello, Luhan.

Qualidade microbiológica de peixes e frutos do mar comercializados em Botucatu, SP / Luhan Caramello. - Botucatu, 2013

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Vera Lúcia Mores Rall

Capes: 21202001

1. Peixe - Microbiologia. 2. Pescados. 3. Salmonella. 4. Staphylococcus aureus.

Palavras-chave: Aureus; Coliformes; Microbiologia; Peixe; Salmonela.

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho primeiramente as minhas duas filhas, Luana e Lívia, que me inspiraram e me fizeram seguir em frente, motivando-me a cada dia levantar da cama e dar continuidade ao trabalho, apesar das dificuldades encontradas. Também dedico a minha esposa, Nayara, que me apoiou e colaborou sempre que precisei de ajuda, inclusive meus pais, Carlos e Léia: todos que deram o suporte para que um dia estivesse aqui.

Quero agradecer também minha professora e orientadora, Vera, por ter me recebido em sua sala e ter me aceitado como um aprendiz em seu laboratório, além de ter sanado quaisquer dúvidas a respeito do projeto e outras dificuldades que tenham surgido durante o trabalho.

Ainda, agradeço aos colegas de laboratório pelo companheirismo e suporte dado, além dos técnicos do departamento e inclusive os professores que compartilharam seus conhecimentos comigo, fazendo-me chegar onde estou.

SUMÁRIO

RESUMO.....	06
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	07
1.1 SALMONELLA SPP.....	09
1.2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS.....	11
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE.....	14
3.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	14
3.2.1 PREPARO DAS AMOSTRAS E SUAS DILUIÇÕES.....	14
3.2.2 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES.....	14
3.2.3 ENUMERAÇÃO DE ESTAFILOCOCCOS COAGULASE POSITIVA.....	15
3.2.4 DETECÇÃO DA PRESENÇA DE SALMONELLA.....	16
3.3 PCR.....	16
3.3.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA DAS CEPAS.....	16
3.3.2 AMPLIFICAÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO.....	17
3.3.3 VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS.....	18
3.4 PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS CLÁSSICAS POR CEPAS DE S. AUREUS.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5 CONCLUSÃO.....	27
6 LISTA DE TABELAS E IMAGENS.....	28
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

RESUMO

O pescado e seus derivados têm uma grande importância na dieta, em todo o mundo. Sabe-se que peixes e frutos do mar fortalecem o sistema imunológico, contribuem para a redução dos níveis de colesterol, diminuem as chances de depressão, ajudam na formação dos músculos e protegem contra doenças cardiovasculares. Também, são ricos em vitaminas lipossolúveis A, D e E, além do ômega 3. Muitas vezes, esses produtos são consumidos crus ou com pouco preparo e com isso faz-se necessário medidas higiênico- sanitárias, pois podem ser contaminados com micro-organismos causadores de doenças. A análise microbiológica dos alimentos para se verificar a presença de micro-organismos prejudiciais é fundamental para se conhecer as condições de higiene nas quais estes alimentos foram preparados. Assim, 80 amostras de peixes e frutos do mar de peixarias e supermercados de Botucatu, SP, foram analisadas com o objetivo de verificar se esses alimentos estão dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, através da RDC nº12, através da detecção da presença de *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* e determinação do número mais provável de coliformes termotolerantes (CT), mesmo que este último não faça parte dos parâmetros para esse alimento, mas foi pesquisado para avaliação de suas condições higiênicas. Cada amostra (25 gramas) foi homogeneizada em 225ml de água peptonada e para a detecção de *S. aureus*, utilizou-se método *spread* Baird Parker, seguida de catalase, coagulase e kit Dry Spot. Para a detecção de *Salmonella*, utilizou-se caldo tetrationato (35°C/24h) e Rapaport (42°C/24h), semeados em ágar SS e XLD. As colônias foram testadas em TSI, ágar fenilalanina e testadas em poli soros somático e flagelar. Quanto aos CT, empregou-se a técnica de tubos múltiplos, inoculando diluições da amostra em caldo Lauril sulfato, na fase presuntiva e depois em caldo EC (45°C) na fase confirmatória. De 80 amostras, 5 (6,25%) se apresentaram fora da legislação, sendo 3 (3,75%) pela presença de *Salmonella* e duas pela presença de *S. aureus* ($1,1 \times 10^3$) acima do permitido na RDC nº12 (10^2). Ainda, 54 amostras (67,5%) apresentaram coliformes termotolerantes, sendo que 6 amostras (7,5%) acima de 10^2 . Pela presença de patógenos importantes e de CT, evidenciam-se condições higiênico sanitárias deficientes e que pode levar a infecções e intoxicações de origem alimentar, ainda mais pelo fato de que o consumo de peixe cru é prática comum, por uma parte da população.

INTRODUÇÃO GERAL

Os peixes representam uma das mais importantes fontes proteicas de origem animal para a alimentação humana, com alta digestibilidade e teores bastante satisfatórios de gorduras insaturadas, de vitaminas e minerais, podendo ser consumido por pessoas de qualquer idade (GERMANO *et al.*, 1998). No Brasil, apesar da extensa costa marítima e da abundância de bacias hidrográficas que recortam o território nacional, o consumo do pescado ainda é pouco expressivo, tendo em média um consumo de 9,75 kg por habitante em 2010, tendo um aumento de 8% em relação a 2009. Em 2006 esse consumo era de 7,28 kg (MPA, 2010).. No entanto, nos últimos anos, tem-se verificado um aumento da procura por uma alimentação mais saudável pelas populações de média e alta renda e a oferta de peixe de qualidade pode direcionar o consumo, em especial, por meio de novas formas de apresentação deste alimento (GERMANO *et al.*, 1998).

O pescado e seus derivados têm uma grande importância na dieta de todo o mundo (FELDHUSEN, 2000). Sabe-se que peixes, camarões, siris, lulas, polvos, ostras, mariscos e mexilhões fortalecem o sistema imunológico, contribuem para a redução dos níveis de colesterol, evitam o diabetes, diminuem as chances de depressão, ajudam na formação dos músculos e protegem contra doenças cardiovasculares. São ricos em vitaminas lipossolúveis A, D e E, além do ômega 3.

Entretanto, muitas vezes, esses produtos são consumidos crus ou com pouco preparo e com isso fazem-se necessárias medidas higiênicas desde a pesca até o preparo, uma vez que pode ocorrer contaminação por micro-organismos causadores de doenças. Os micro-organismos patogênicos podem chegar ao alimento por várias vias, sempre refletindo condições precárias de higiene durante a produção, armazenamento, distribuição ou manuseio em nível doméstico (SILVA JR., 1995).

Entende-se por toxinfecção alimentar, as doenças microbianas de origem alimentar, que podem ser subdivididas em intoxicações, causadas pela presença de uma toxina bacteriana pré formada no alimento e infecção, causada pela entrada de bactéria no organismo, através da ingestão de alimentos contaminados, com conseqüente reação orgânica, pela presença de bactérias ou de seus metabólitos (FRAZIER; WESTHOFF, 1993). Os sintomas mais comuns dessas enfermidades envolvem diarreia, náuseas, vômitos

e febre. Cabe ressaltar que a diarreia constitui a maior causa de morbidade e mortalidade em recém-nascidos e crianças de até cinco anos (SIQUEIRA et al., 2006).

Segundo Carvalho (2005), os alimentos contaminados por bactérias patogênicas são indesejáveis sob o aspecto de saúde pública, visto que estes representam risco a saúde do consumidor, especialmente em populações debilitadas. Segundo Jay (2005), os cinco fatores mais frequentemente envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares são refrigeração inadequada, alimentos preparados com muita antecedência, manipuladores infectados com hábitos de higiene pessoal deficientes, cozimento ou processamento inadequado e a manutenção de alimentos sob aquecimento em temperaturas não seguras.

Segundo Feldhusen (2000), as bactérias patogênicas mais encontradas na pele, escamas, brânquias e no intestino de peixes comercializados são *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sp*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *C. botulinium* e *Aeromonas hydrophila*;

A contaminação dos peixes pode ocorrer ainda em seu habitat, pois o lançamento de esgotos nas águas de reservatórios, lagos, lagoas, rios, mar e tanques podem contaminar o pescado oferecendo risco para o consumidor. A maneira como são capturados também pode levar a contaminação. Durante a captura principalmente com rede de arrasto, os peixes são arrastados pelo fundo do mar, revolvendo sedimentos e que acabam carreando uma carga microbiana de 10 a 100 vezes maior quando comparada à captura por anzol (HUSS et al., 2000; SCHLUNDT, 2002; REIJI, DEN AANTREKKER, 2004; HAMADA-SATO et al., 2005; BASTI et al., 2006).

Outra etapa importante é o manejo do pescado, desde a captura, ainda nos barcos, até o seu destino final, passando por fases de beneficiamento e transporte. Durante o beneficiamento, o peixe pode ser eviscerado, preparado em files e postas, onde pode ocorrer a contaminação se não houver boas práticas de manipulação, higienização e sanitização (HUSS et al., 2000). A água que entra em contato com os alimentos de origem animal, inclusive a usada para higienização de equipamentos em indústrias, deve ter o mesmo padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano, que exige ausência de coliforme termotolerante em 100 ml de água (BRASIL, 2003).

Visando a saúde da população, a Resolução da Diretoria Colegiada, RDC, nº12 (2001) definiu que pescado, ovas de peixes, crustáceos e moluscos cefalópodes “in natura”, resfriados ou congelados, não consumidos cru devem apresentar o seguinte padrão microbiológicos: ausência de *Salmonella* em 25 g e tolerância de até 103 NMP/g de alimento de estafilococos coagulase positiva.

Segundo Granada et al. (2003), no Estado de São Paulo, foi realizado um levantamento dos surtos de enfermidades transmitidas por alimentos, no período de 1994 a 1998, sendo constatado que os principais alimentos envolvidos eram: carnes e derivados, aves e derivados, peixes e derivados, produtos de confeitaria, pratos prontos para consumo, leite e derivados, amiláceos e outros (não enquadrados nas classes anteriores). Também foi verificado que os patógenos mais frequentes foram: Estafilococos coagulase positiva (43,7%), *Salmonella* spp. (33,5%) e *Bacillus cereus* (16,2%).

***Salmonella* spp**

A *Salmonella* sp é uma das mais importantes causas de doenças de origem alimentar (DOA) no mundo (THEYS, 2008). É um gênero que compreende bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, pertencentes à família das enterobactérias (Enterobacteriaceae), móvel, exceto *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, não formadora de esporos. Esses microorganismos multiplicam-se entre 5°C e 47°C, com um crescimento ótimo entre 35-38°C, mas estes valores variam de acordo com o sorotipo (FDA, 2006).

As espécies de salmonelas são distribuídas amplamente pelo ambiente, sendo encontradas no trato gastrointestinal de aves, insetos, mamíferos e répteis. Apesar do meio aquático não ser um reservatório natural, ela pode estar presente devido à contaminação fecal, podendo ser detectada em peixes e produtos derivados (FDA, 2006). As aves têm se revelado um ótimo vetor, disseminando as salmonelas pelas fezes e a presença da bactéria no canal ovopositor das galinhas é capaz de contaminar as gemas dos ovos (FDA, 2006). As doenças causadas pelas salmonelas são a febre tifóide, febres entéricas e enterocolites (salmoneloses).

A febre tifóide é causada pela *S. Typhi* e o homem é o único reservatório desta bactéria, sendo também a principal fonte de contaminação. Pode ser altamente infectante e possui uma taxa de mortalidade em cerca de 10% entre os infectados. A transmissão é via

oral-fecal, através de água e alimentos contaminados. Os bacilos são, periodicamente, eliminados nas fezes ou urina do doente até o terceiro mês do início do quadro clínico em 10% dos doentes e até 1 ano e, provavelmente, por toda a vida, em 1 a 5% dos doentes crônicos. Os sintomas são febre alta, diarreia, vômitos e se a bactéria atingir o sangue pode levar a um quadro de septicemia (FRANCO, LANDGRAF, 2003; EDUARDO, MELLO, 2006).

S. paratyphi causa a febre entérica, que é semelhante à febre tifóide, porém os sintomas são mais brandos. As salmoneloses são causadas pelas demais salmonelas e, a sintomatologia envolve diarreia, vômito, febre e dores abdominais. Uma das espécies isolada frequentemente de ovos, é a *S. Enteritidis* (FRANCO, LANDGRAF, 2003; FDA, 2006).

Em 2006, nos Estados Unidos, 6.655 dos 17.252 casos confirmados de DOA foram causados por *Salmonella*, sendo *Salmonella Typhi*, responsável por 1157 (THEYS, 2008). Todo ano, aproximadamente, 40.000 casos de salmoneloses são relatados nesse país. Como muitos casos não são diagnosticados e/ou relatados, estima-se que o número real de infecções seja três vezes maior. Cerca DE 400 pessoas morrem todos os anos devido à essa doença e crianças, idosos e imunodeficientes são os mais susceptíveis (CDC,2008).

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus são cocos, Gram-positivos, anaeróbios facultativos, pertencentes à família Staphylococcaceae. Possuem um crescimento ótimo a 37°C, podendo variar numa faixa de temperatura entre 7 a 46°C. Os estafilococos podem ser encontrados na água, ar, poeira, leite e esgotos. O homem e os animais são reservatórios naturais desses micro-organismos e o principal habitat é o nariz e a pele. Os portadores podem atingir até 60% dos indivíduos saudáveis, havendo uma média de 25 a 30% da população que é portadora de estirpes produtoras de enterotoxinas.

Segundo a FDA (2006), os estafilococos são responsáveis por, aproximadamente, 45% das toxinfecções do mundo, sendo que uma dose menor que 1µg de enterotoxina é suficiente para produzir os sintomas da intoxicação por *Staphylococcus aureus*. Esta dose de enterotoxina é alcançada quando a população atinge mais que 105 UFC/g de alimento. Algumas cepas são capazes de produzir enterotoxinas estafilocócicas, que são termoestáveis e responsável pelas intoxicações alimentares no homem. A transmissão ocorre quando há ingestão dessas enterotoxinas, produzidas no alimento (FORSYTHE, 2002; FRANCO, LANDGROF, 2003; FDA, 2006).

A intoxicação alimentar estafilocócica, geralmente possui um início abrupto e violento, os sintomas aparecem em média de 2 – 4 horas após a ingestão do alimento com náusea, vômitos e cólicas, prostração, pressão baixa e temperatura subnormal. Alterações na frequência cardíaca podem também ser observadas. A recuperação ocorre em torno de dois dias, porém, alguns casos podem levar mais tempo ou exigir hospitalização. O diagnóstico é fácil, especialmente quando há um grupo de casos, com predominância de sintomas gastrintestinais superiores e com intervalo curto entre o início dos sintomas e ingestão de um alimento comum. A real frequência da intoxicação estafilocócica é desconhecida, seja por erro diagnóstico, por ser similar a outras intoxicações, por coleta inadequada de amostras para testes laboratoriais, exames laboratoriais impróprios ou investigações epidemiológicas inadequadas dos surtos. No estado de São Paulo foram notificados somente 25 surtos por *S. aureus*, envolvendo quase 200 pessoas, nos anos de 2001 e 2002 (CVE, 2003).

As enterotoxinas estafilocócicas clássicas são exoproteínas hidrossolúveis, com peso molecular de 26 a 29 KDa, caracterizadas por uma ponte dissulfeto, próximo ao centro

da molécula. Os cinco tipos sorológicos clássicos foram identificados e designados pelas letras A, B, C, D e E (BERGDOLL & ROBBINS, 1973). Apresentam grandes quantidades de lisina, ácido aspártico, glutâmico, tirosina, dois resíduos de triptofano e cistinas, formando a cisteína, à qual, provavelmente, se atribui o sítio de toxicidade. A composição dos aminoácidos das toxinas A, D, E, B, C1, C2 e C3 são semelhantes (BERGDOLL, 1989).

As enterotoxinas estafilocócicas são consideradas superantígenos, que se caracterizam por ligações simultâneas ao Complexo Maior de Histocompatibilidade (CMH) de classe II na célula apresentadora de antígeno e aos receptores de células T, sem a presença de antígenos específicos. Com essa ligação, ocorrem efeitos sistêmicos como febre alta, vômito, diarreia e disfunções hepáticas e renais (FERNANDEZ et al., 2006).

Como o *S. aureus* é um indicador das condições higiênicas e sanitárias, a presença deste organismo também pode indicar condição pouco higiênicas durante o processamento, armazenamento e possível presença de cepas toxigênicas. A contaminação do produto pode ser resultado da combinação de manipulação indevida, armazenamento inadequado e contaminação cruzada. (SIMON, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Verificar se peixes e frutos do mar comercializados frescos ou congelados, em supermercados e peixarias no município de Botucatu estavam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, através da RDC nº12.

2.2. Objetivos específicos

- pesquisa da presença de *Salmonella* sp;
- a determinação do número mais provável de coliformes termotolerantes;
- enumeração de Estafilococos coagulase positiva (ECP) e identificação de *S. aureus*;
- pesquisa dos genes produtores de enterotoxinas clássicas, nas cepas de *S. aureus*. A partir das cepas de *S. aureus* isoladas, o aluno de Iniciação Científica contou com o auxílio de um pós graduando (Nível Doutorado), para a pesquisa desses genes, por PCR;
- pesquisa da produção de enterotoxinas *in vitro*, pelas cepas positivas para a presença de qualquer um desses genes, pelo método de aglutinação reversa passiva em látex (RPLA).

Apesar da determinação do número mais provável de coliformes termotolerantes não fazer parte dos parâmetros, para esse alimento, na RDC N°12 (2001), esses testes foram realizados, por ser básico em microbiologia de alimentos e também para avaliar a condições sanitárias desse alimento, apesar de não haver parâmetros de comparação na lei.

3. MATERIAL E MÉTODOS:

3.1. Obtenção das amostras para análises

Foram coletadas 80 amostras de peixes inteiro, filés ou em, pedaços e frutos do mar em peixarias e supermercados da cidade de Botucatu – SP. As amostras foram mantidas sob refrigeração, em caixa isotérmica contendo gelo reciclável, até o momento do processamento no laboratório.

3.2. Análises microbiológicas

3.2.1. Preparo das amostras e suas diluições:

Para a análise, 25 gramas da amostra foram pesados e homogeneizados em 225 ml de água tamponada esterilizada, em sacos plásticos apropriados, que foram levados ao Stomacher Lab Blender 400 por trinta segundos. A partir desta diluição inicial de 10^{-1} , preparou-se uma série de diluições decimais, utilizando-se salina.

3.2.2. Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes (KORNACKI & JOHNSON, 2001)

Cada diluição da amostra foi inoculada em volumes de 1 mL, em cada série de três tubos por diluição, contendo 10 mL de caldo lauril sulfato com um tubo de Durham invertido. Os tubos foram incubados a 35°C por 24-48 horas. Os inóculos positivos se revelaram pela observação da produção de gás no tubo de Durham. A seguir, três alçadas de cada tubo positivo foram repicadas em tubos de ensaio com 5 mL de caldo EC para a confirmação de coliformes termotolerantes (CT). Todos os tubos de EC conteram tubos de Durham invertidos. O caldo EC foi inoculado a 45°C por 24 horas. Após o período de incubação, a leitura foi realizada pela observação da presença de gás no tubo de Durham invertido. A seguir, utilizando-se a tabela do NMP, foram calculados os NMP de CT por grama de amostra analisada.

3.2.3. Enumeração de estafilococos coagulase positiva (LANCETTE & BENNETT, 2001)

Para a enumeração dos estafilococos, foi utilizado o método da semeadura em superfície, onde 0,1 mL das diversas diluições da amostra foram depositados em placas de Petri com ágar Baird-Parker suplementado com telurito de potássio e solução de gema de ovo e o inóculo foi espreado com o auxílio de um bastão de vidro em L. Após a incubação a 35°C por 48 horas, foi realizada a contagem da placa que apresentou entre 25 e 250 UFC (Unidades Formadoras de Colônias). As colônias suspeitas de estafilococos coagulase positiva apresentam cor negra, com ou sem halo e um máximo de cinco colônias foram isoladas e repicadas para tubos com TSA inclinado, que foram incubados por 24 horas a 35°C. Foi realizado o teste da produção de catalase e coloração pelo método de Gram. Após estes testes iniciais, foi realizado o teste da coagulase em tubo e termonuclease.

Para identificação de *S. aureus*, as cepas positivas nas duas provas anteriores foram submetidas ao kit "Staphylect Test Dry Spot", onde partículas azuis de látex são recobertas com fibrinogênio humano e imunoglobulinas tipo G contra a proteína A de *S. aureus*, o Fator Clumping e a cápsula de *S. aureus* meticilina-resistente.

3.2.4. Deteção da presença de *Salmonella* (ANDREWS et al, 2001)

Para a detecção da presença de *Salmonella*, 25 gramas da amostra do alimento foram homogeneizados em 225 mL de água peptonada tamponada, em um saco plástico no "Stomacher" durante dois minutos. Após esse período, o homogeneizado foi transferido a um Erlenmeyer e incubado a 35°C por 24 horas. A seguir, 1 mL foi semeado em um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo tetrionato ao qual foi adicionado um volume de 0,2 mL de iodeto de potássio imediatamente antes do uso. O tubo foi incubado a 35°C por 24 horas. Outra alíquota de 0,1 mL foi transferida para um tubo com 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis e incubado a 42°C por 24 horas. Após este período, uma alçada de cada tubo foi semeada em placas de Petri contendo ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) e placas contendo ágar *Salmonella-Shigella*. Após incubação de 24 horas a 35°C, as colônias características de *Salmonella* foram isoladas e repicadas para tubos de ensaio contendo ágar tripticase soja inclinado (TSA), sendo consideradas as cepas estoque. Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas. A partir desse crescimento foram feitos repiques em tubos de ensaio contendo ágar tríplice açúcar ferro inclinado (TSI) e em tubos com ágar

fenilalanina inclinado. Os tubos foram incubados a 35°C por 18-24 horas. Após os resultados esperados nestes 2 testes, a cepa foi submetida ao sistema API-20E (Biomérieux), que apresentará 20 provas bioquímicas para enterobactérias. Após leitura positiva no API, as cepas foram testadas frente ao soro polivalente somático e depois da positividade deste, ao soro flagelar.

3.3. PCR

3.3.1. Extração e Purificação de DNA das cepas de *S. aureus*

Para extração e purificação do DNA, as cepas isoladas foram cultivadas em caldo BHI, a 35°C/24 h e 1mL de cada crescimento foi transferido para tubos de microcentrifuga de 1,5 mL e submetidos a extração e purificação do DNA empregando-se o kit comercial “MiniSpin” (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante.

Para tal, o tubo foi centrifugado em rotação máxima (13.000 rpm) por 30 segundos (Eppendorf 5415R), o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 40µL de tampão de lisozima (USB) e imediatamente homogeneizado com o auxílio de um vortex, para ressuspensão das células bacterianas. Em seguida, foram adicionados 10 µL de lisozima, o tubo foi homogeneizado e mantido em temperatura ambiente por 15 minutos, com homogeneização ocasional. Após, foram adicionados 10µL de proteinase K (USB), homogeneizado e incubado a 55°C/15 minutos, homogeneizando ocasionalmente. Após o período de incubação, foram adicionados 500µL de solução de extração, homogeneizado e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos.

A mistura foi transferida para uma coluna MiniSpin e centrifugada a 8.000 rpm durante 1 minuto. O volume filtrado foi descartado e novamente foram adicionados 500µL de solução de extração na coluna que foi centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto, descartando-se o volume filtrado. Em seguida, foram adicionados 500µL de solução de lavagem e centrifugado a 12.000 rpm por 3 minutos, com descarte do filtrado. A coluna foi transferida para um tubo demicrocentrífuga de 1,5 mL (Axygen), com adição de 500µL de solução de eluição (água Milli Q autoclavada e previamente aquecida a 56°C em banho-maria), incubado à temperatura ambiente por 1 minutos e centrifugado a 8.000 rpm durante

1 minuto. A amostra ficou congelada a - 20°C até o momento do uso para a reação em cadeia pela polimerase (PCR).

3.3.2. Amplificação do ácido nucléico (PCR)

Para as reações de PCR foram utilizados tubos de microcentrífuga de 0,5 mL num volume total de 25 µL, composto por 2,5 µL de PCR Buffer 10x, 2,0 µM de Cloreto de Magnésio, 200 µM de cada dNTP, 1 U de Taq DNA Polimerase, 10 picomoles de cada *primer* (Tabela 1), água ultrapura autoclavada (qsp) (Milli-Q Plus, Millipore) e 3 µL da amostra de DNA. A incubação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) empregando-se os parâmetros de um ciclo inicial a 94°C durante 5 minutos para desnaturação inicial, 94°C durante 2 minutos para desnaturação e 72°C durante 1 minuto para extensão. Em relação à temperatura de anelamento dos “primers”, as diferentes temperaturas estão listadas na Tabela 1. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água ultrapura.

Os controles positivos usados para as enterotoxinas serão *S. aureus* ATCC 13565 (SEA), ATCC 14458 (SEB), ATCC 19095 (SEC), FRI 361 (SED).

Tabela 01: Oligonucleotídeos e suas propriedades utilizados na detecção de genes produtores de enterotoxinas, nas cepas de *Staphylococcus* sp.

Gene	Primer	Seqüência	Tamanho produto (bp)	Temperatura de anelamento	Referências
<i>Sea</i>	SEA-1	ttggaaacggttaaacgaa	120	50°C	JOHNSONet al. (1991)
	SEA-2	gaaccttccatcaaaaaca			
<i>Seb</i>	SEB-1	tcgcatcaaactgacaaacg	478	50°C	JOHNSONet al. (1991)
	SEB-2	gcaggtactctataagtgcc			
<i>Sec</i>	SEC-1	gacataaaagctaggaattt	257	50°C	JOHNSONet al. (1991)
	SEC-2	aaatcggattaacattatcc			
<i>Sed</i>	SED-1	ctagtttgtaatatctcct	317	50°C	JOHNSONet al. (1991)
	SED-2	taatgctatatcttataggg			

bp: pares de bases

3.3.3. Visualização dos produtos amplificados

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese (Electrophoresis Power Supply Model EPD 600 – Amersham-Pharmacia Biotech Inc.) em gel de agarose 1,5% (Sigma Aldrich) em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) e revelados com SYBR Green (Invitrogen). Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com marcadores de DNA de 50 bp (50 Base Pair Ladder – Amersham – Pharmacia Biotech Inc.), sendo analisados e fotografados em analisador de imagens (Alphaimager – Alpha esasy FC Software – AlphaInotech Corporation).

3.4. Produção de enterotoxinas clássicas por cepas de *S. aureus*

As cepas de *S. aureus* foram cultivadas em caldo BHI e incubadas a 37°C/24 h. A seguir, 0,1ml destes crescimentos foram transferidos para placas de ágar BHI, acrescido de 1% de extrato de levedura, com um papel celofane esterilizado na sua superfície. Esse volume foi espalhado com o auxílio de uma alça em “L” e essas placas foram incubadas a 37°C/24 h. Após este período, uma alíquota de 2,5 ml de Na₂HPO₄ 0,01M foi adicionada à superfície e, após homogeneização com o crescimento, o volume foi transferido para um tubo de microcentrífuga, submetido a uma centrifugação a 10.000 rpm/10 minutos/4°C (ROBBINS et al., 1974).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 80 amostras analisadas, três foram positivas (3,75%) para a presença de *Salmonella* sp, isoladas de pescada branca, camarão e filé de salmão. Quanto à enumeração de *Staphylococcus aureus*, somente 2 amostras apresentaram esse patógeno (2,5%), segundo Tabela 2..

Em relação aos coliformes termotolerantes (CTe), 6 amostras (7,5%) apresentaram contaminação superior a 10^3 NMP CTe/g e em 20 (25%), observou-se <3 NMP CTe/g, como observado na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados das análises microbiológicas de 80 amostras de peixes e frutos do mar, comercializadas em Botucatu, SP, 2013 (continua).

Amostra	CTe (NMP/g)	<i>S. aureus</i> (UFC/g)	<i>Salmonella</i>
Filé de Saint Peter	<3	<100	Ausente
Lula	<3	<100	Ausente
Manjuba	$9,3 \times 10$	<100	Ausente
Pescada	23	<100	Ausente
Filé de Saint Peter	<3	<100	Ausente
Camarão	<3	<100	Ausente
Filé de salmão	$3,8 \times 10^4$	<100	Presente
Posta Pirarucu	<3	<100	Ausente
Peixe Espada	2×10^4	<100	Ausente
Salmão	9,2	<100	Ausente
Manjuba	$1,1 \times 10^3$	<100	Ausente
Filé de Saint Peter	7,4	<100	Ausente
Camarão	<3	<100	Ausente
Manjuba	7,2	<100	Ausente
Pescada branca	$4,6 \times 10^2$	<100	Presente

CT: coliformes termotolerantes; NMP/g: número mais provável por grama, UFC/g: Unidades Formadoras de Colônias por grama.

Tabela 2: Resultados das análises microbiológicas de 80 amostras de peixes e frutos do mar, comercializadas em Botucatu, SP, 2013 (continuação).

Amostra	CTe (NMP/g)	<i>S. aureus</i> (UFC/g)	<i>Salmonella</i>
Camarão	1,1x10 ³	<100	Presente
Filé de salmão	<3	<100	Ausente
Camarão	<3	<100	Ausente
Lambari	43	<100	Ausente
Filé de salmão	3,6	<100	Ausente
Filé truta	2,4x10 ²	9x10 ²	Ausente
Badejo	9,2	<100	Ausente
Filé de pintado	2,4x10 ²	<100	Ausente
Filé de saint-peter	1,1x10 ³	<100	Ausente
Camarão	23	<100	Ausente
Sardinha	<3	<100	Ausente
Filé de Salmão	2,4x10 ²	<100	Ausente
Filé de Saint Peter	93	<100	Ausente
Camarão	23	<100	Ausente
Filé de Salmão	43	<100	Ausente
Lula	23	<100	Ausente
Trilha	93	<100	Ausente
Sardinha	38	<100	Ausente
Filé Salmão	38	<100	Ausente
Filé de Saint Peter	2,4x10 ²	<100	Ausente
Lula	9,2	<100	Ausente
Filé de Saint Peter	2,4x10 ²	<100	Ausente
Camarão	7,4	<100	Ausente
Filé de Salmão	4,6x10 ⁵	<100	Ausente
Sardinha	43	<100	Ausente

CT: coliformes termotolerantes; NMP/g: número mais provável po grama, UFC/g: Unidades Formadoras de Colônias por grama.

Tabela 2: Resultados das análises microbiológicas de 80 amostras de peixes e frutos do mar, comercializadas em Botucatu, SP, 2013 (continuação).

Amostra	CTe (NMP/g)	<i>S. aureus</i> (UFC/g)	<i>Salmonella</i>
Lula	9	<100	Ausente
Camarão	9,2	<100	Ausente
Filé de Salmão	43	<100	Ausente
Camarão	43	<100	Ausente
Sardinha	75	<100	Ausente
Filé de Saint-Peter	38	<100	Ausente
Camarão	20	<100	Ausente
Sardinha	9	<100	Ausente
Pacu	20	<100	Ausente
Filé de Salmão	38	<100	Ausente
Filé de Saint Peter	9	<100	Ausente
Lula	7,4	<100	Ausente
Filé de Salmão	2,4x10 ²	7,0 x10 ²	Ausente
Filé de Saint Peter	3,6	<100	Ausente
Saint Peter	9	<100	Ausente
Camarão	<3	<100	Ausente
Camarão	<3	<100	Ausente
Costela de Pacu	9,2	<100	Ausente
Sardinha	<3	<100	Ausente
Filé de Saint Peter	93	<100	Ausente
Saint Peter	38	<100	Ausente
Filé de Salmão	20	<100	Ausente
Salmão	3,6	<100	Ausente
Majuba	43	<100	Ausente
Lula	<3	<100	Ausente

CT: coliformes termotolerantes; NMP/g: número mais provável po grama, UFC/g: Unidades Formadoras de Colônias por grama.

Tabela 2: Resultados das análises microbiológicas de 80 amostras de peixes e frutos do mar, comercializadas em Botucatu, SP, 2013 (continuação).

Amostra	CTe (NMP/g)	<i>S. aureus</i> (UFC/g)	<i>Salmonella</i>
Sardinha	23	<100	Ausente
Filé de Saint Peter	2,4x10 ²	<100	Ausente
Saint Peter	43	<100	Ausente
Camarão	<3	<100	Ausente
Posta de Pirarucu	23	<100	Ausente
Pacu	20	<100	Ausente
Manjuba	93	<100	Ausente
Lula Inteira	<3	<100	Ausente
Camarão	<3	<100	Ausente
Salmão	<3	<100	Ausente
Saint Peter	<3	<100	Ausente
Filé Pintado	9	<100	Ausente
Filé de Pirarucu	<3	<100	Ausente
Filé de Salmão	3,6	<100	Ausente
Camarão	<3	<100	Ausente

CT: coliformes termotolerantes; NMP/g: número mais provável por grama, UFC/g: Unidades Formadoras de Colônias por grama.

Segundo a RDC nº12 (2001), que dispõe sobre a quantidade limite e os níveis microbiológicos de tolerância encontrados em alimentos de pescado e frutos do mar, deve ocorrer a ausência de *Salmonella* em 25 gramas do alimento, que foi detectada em três das 80 amostras analisadas (3,8%). Esta porcentagem, apesar de baixa, é preocupante pois *Salmonella* é um patógeno que causa doenças graves, além do fato de vários peixes e frutos do mar serem consumidos crus.

Hatha & Lakshmanaperumalsamy (1997) encontraram 14,3% das amostras de peixes frescos positivas para *Salmonella*, valores superiores aos obtidos neste trabalho. Segundo os autores, essa contaminação pode ter ocorrido durante o transporte, pelo uso de água contaminada, presença de excrementos de pássaros aquáticos, embalagens com gelo

sem qualidade e a falta de higiene de manipuladores. Porém, essa alta incidência não é frequentemente observada na literatura. Davies et al. (2001), analisando peixe fresco, coletado na França, Inglaterra e Portugal não observaram a presença de *Salmonella* em nenhuma das 76 amostras e Herrera et al. (2006), ao analisarem 50 amostras de peixes frescos na Espanha, também não isolaram *Salmonella*.

Resultados semelhantes foram observados, aqui na mesma cidade de Botucatu, onde Rall et al. (2011) analisaram 70 amostras de peixes e frutos do mar e *Salmonella* foi observada em 3% das amostras de peixes frescos, mas ao contrário dos resultados da pesquisa atual, não foi ocorrido em congelados. Além disso, foi pesquisado *S. aureus*, isolado em somente uma amostra de peixe fresco e também em baixas contagens, de 10^2 UFC/g

Foi encontrada uma maior proporção de peixes e frutos do mar congelados à disposição para os consumidores na cidade de Botucatu, SP, provavelmente pela distância a ser percorrida até Botucatu, que fica a 250 Km de São Paulo. Também pode indicar uma preferência pelos produtos congelados, pela maior sensação de segurança que transmite aos consumidores.

Alimentos congelados são uma excelente maneira para a conservação dos alimentos em segurança e doenças associadas à alimentos congelados são raras. Entretanto, além de preservar a qualidade dos alimentos, o congelamento também pode permitir a viabilidade de alguns micro-organismos patogênicos. Como foi observado por Lund (2000), bactérias gram-negativas são mais susceptíveis ao congelamento do que as gram-positivas, porém algumas espécies podem sobreviver bem em alimentos congelados, dependendo da matriz do alimento e de outros fatores. Como já foi observado por Archer (2000), apesar da *Salmonella* ser uma bactéria Gram-negativa, sua resistência à baixas temperaturas é bastante conhecida. *Salmonella* Typhimurium continuou estável em peixes congelados a -22°C por mais de um ano (RAJ & LISTON, 1961). Escartín et al. (2000) também demonstraram que, embora tenha ocorrido queda no número populacional, esse micro-organismo se manteve por semanas em temperatura de congelamento. Nesse estudo, uma das amostras positivas para *Salmonella*, o filé de salmão, era congelado.

Os níveis máximos permitidos, pela RDC N°12 (2001), de estafilococos coagulase positiva é de 10^3 UFC/g. Assim, das 80 amostras somente 2 (2,5%) foram positiva para a

presença desse micro-organismos e ambas apresentaram contaminação dentro dos parâmetros legais. Geralmente, a contaminação de alimentos por *S. aureus* está diretamente relacionada à manipulação inadequada, por parte dos manipuladores de alimentos (ANGELILLO et al., 2000) e as amostras onde se detectou essa contaminação eram filés, demonstrando a falta de higiene no momento da filetagem. Além disso, nessas amostras também foram detectas a presença de CTe.

As placas de Baird Parker apresentaram alta contaminação por estafilococos coagulase negativa, ainda abundante na diluição 10^{-3} , indicando a qualidade higiênica ruim do produto. De acordo com Peterson (1962a e1962b), o crescimento do *S. aureus* é reprimido pela presença de outras populações de bactérias encontradas naturalmente nos alimentos, devido à competição por nutrientes e pela modificação do ambiente para condições menos favoráveis para o seu crescimento. Devido a isso, pode-se sugerir que a ausência de *S. aureus* pode ter ocorrido devido à grande contaminação das amostras por outras bactérias não identificadas neste estudo.

A baixa porcentagem de amostras contaminadas por *S. aureus* difere do estudo de Simon (2007), que pesquisou pescados e frutos do mar, na Índia, e detectou a presença de *S.aureus* em 17% de suas amostras. No Brasil, resultados similares aos de Simon (2007) foram encontrados por Ayulo et al. (1994).

Somente duas amostras foram positivas para *S. aureus* e, como já dito, foi realizado a PCR para a detecção dos genes responsáveis pela produção das enterotoxinas clássicas nessas duas cepas, com resultados negativos. A Figura 1 apresenta a PCR das cepas padrão, utilizados como controle positivo das reações. Como um dos objetivos era a pesquisa da produção in vitro dessas toxinas, o aluno realizou esses testes com as cepas padrão. De qualquer maneira, infelizmente, o baixo número de amostras positivas e a ausência dos genes, não permitem que haja uma discussão desses dados.

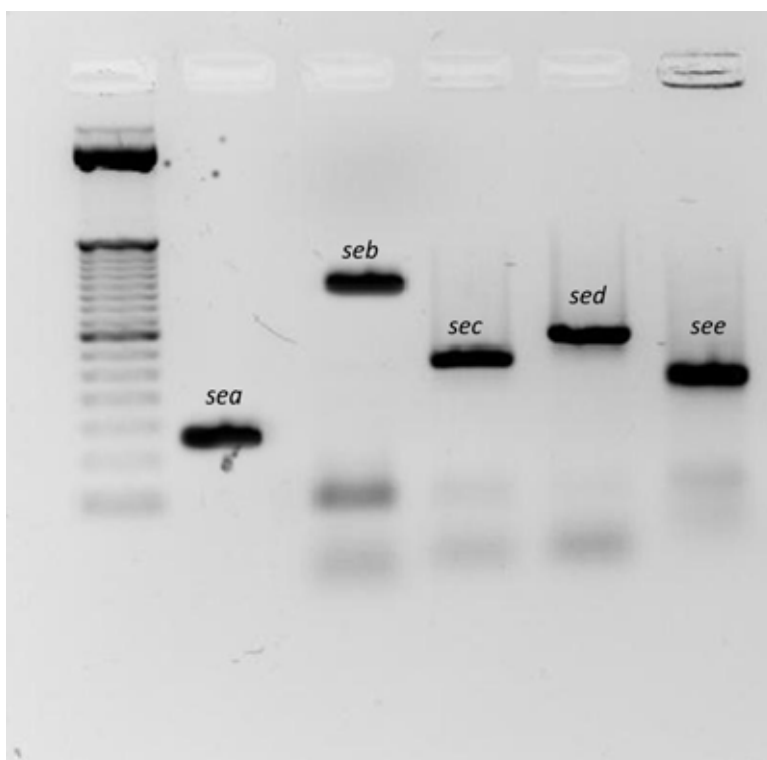


Figura 1. Gel de eletroforese do produto da PCR das enterotoxinas . Poço 1: marcador de peso molecular de 50 pb; poço 2: ATCC 13565 (*sea* - 120 pb), poço 3: ATCC 14458 (*seb* - 478 pb); poço 4: ATCC 19095 (*sec* - 257 pb); poço 5: FRI 361 (*sed* - 317 pb) e poço 6: SEE (ATCC 27664 - 209 pb).

Apesar de não serem parâmetros microbiológicos da RCD, como já observado anteriormente, os CTe foram analisados, para a verificação das condições higiênicas-sanitárias do produto final e entre as 80 amostras, 60 (75%) apresentaram contagens que variaram de 3,6 a $4,6 \times 10^5$ NMP/g.

Ocorreu um maior número de amostras de peixe fresco contaminadas por coliformes termotolerantes, com 39 amostras (65%) em relação ao congelado (21 amostras, sendo 35%), pois em baixas temperaturas há uma redução ou inibição do crescimento de microorganismos. Entre as amostras de peixes, fresco ou congelado, coletadas como filé ou posta, observou-se que a contaminação por bactérias termotolerantes eram maiores em filé, pois o preparo deste inclui evisceração, retirada da pele e “filetagem”, O preparo do pescado em filé exige maior manipulação quando comparado ao peixe fatiado em postas, assim como relataram Munkundun et al. (1986) e Vieira et al. (2004).

5. CONCLUSÃO

Apesar de apenas 3,8% das amostras analisadas estarem em desacordo com a RDC nº12 (2001), isto pode indicar risco à saúde dos consumidores, pois *Salmonella* é um dos principais patógenos responsáveis por doenças ocasionadas por alimentos. Além disso, a presença de *Salmonella* em uma amostra congelada permite concluir que apesar do congelamento ser uma boa maneira para conservação, este processo não elimina totalmente os patógenos do alimento.

A população deve estar ciente dos perigos que esses alimentos podem representar, adquirindo somente produtos de boa qualidade, mantendo-os sob refrigeração até o momento do consumo, somente após processo térmico adequado, não devendo ser consumidos crus.

6. LISTA DE TABELAS E IMAGENS

Tabela 01: Oligonucleotídeos e suas propriedades utilizados na detecção de genes produtores de enterotoxinas, nas cepas de *Staphylococcus* sp.....18

Tabela 2: Resultados das análises microbiológicas de 80 amostras de peixes e frutos do mar, comercializadas em Botucatu, SP, 2013.....20

Figura 1. Gel de eletroforese do produto da PCR das enterotoxinas . Poço 1: marcador de peso molecular de 50 pb; poço 2: ATCC 13565 (*sea* - 120 pb), poço 3: ATCC 14458 (*seb* - 478 pb); poço 4: ATCC 19095 (*sec* - 257 pb); poço 5: FRI 361 (*sed* - 317 pb) e poço 6: SEE (ATCC 27664 - 209 pb).....26

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, W.H.; FLOWERS, R.S.; SILLIKER, J. et al. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. **Washington: Apha**, 2001, 357-380.

ANGELILLO, I.F.; VIGGIANI, N.M.A.; RIZZO, L. et al. Food handlers and foodborne diseases: knowledge attitudes and reported behavior in Italy. **J. Food Protect.**, v. 3, p. 381-385, 2000.

ARCHER, D.L.; Freezing: an underutilized food safety technology? **Int J Food Microbiol**, v. 90, p. 127–138, 2004.

AYULO, A. M. R., MACHADO, R. A., & SCUSSEL, V. M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in wash and seafood from the Southern region of Brazil. **Int J Food Microbiol**, v. 24, p. 171–178, 1994.

BASTI, A.A.; MISAGHI, A.; SALEHI, T. Z.; KAMKAR, A. Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. **Food Control**, v. 17, p.183-188, 2006.

BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M.P. Bacterial foodborne pathogens. **New York: Marcel Dekker**, p. 464-523, 1989.

BERGDOLL, M.S.; ROBBINS, R.N. Characterization of types staphylococcal enterotoxins. **J. Milk Food Technol.**, v. 36, p. 610-2, 1973.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária.** Regulamento Técnico sobre "Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Aprovado a Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997 e regulamentado pela Resolução RDC nº 175, 08 de julho de 2003. Brasília, DF, 2003.

CARVALHO, E. P. Toxinfecções alimentares: textos acadêmicos. **Lavras: Universidade Federal de Lavras/FAEPE**, 2005. 75p.

CDC, 2008, Division of foodborne, bacterial and mycotic diseases, Salmonellosis, How common is salmonellosis?, 2008. Disponível em

http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/salmonellosis_gi.html. Acesso em: 11 dez. 2008.

CDC, Centers of Disease Control and Prevention (2005) Foodborne illness, 2005. Disponível em <http://www.cdc.gov/ncidod>. Acesso em: 21 mai. 2007.

CDC, Centers of Disease Control and Prevention. Prevention Emerging Infectious Diseases: A Strategy for the 21st Century, 2003. Disponível em <http://www.cdc.gov/ncidod>. Acesso em: 24 ago. 2007.

CVE, Centro de Vigilância Epidemiologia. Doenças transmitidas por Alimentos, 2003. Disponível em http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/dta_menu.htm. Acesso em: 11 dez. 2013.

CVE, Centro de Vigilância Epidemiologia. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos Notificados ao CVE, 2008. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dados/DTAESPjul08.xls>. Acesso em: 10 dez. 2008.

DAVIES, A.R. et al. Incidence of food borne pathogens on European fish. **Food Control**, v. 12, p. 67–71, 2001.

EDUARDO, MBP; MELLO, MLR Febre Tifóide, 2006. Disponível em http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dta_estat.htm. Acesso em: 22 ago.2007.

ESCARTÍN E.F.; LOZANO S.J.; GARCIA O.R. Quantitative survival of native *Salmonella* serovars during storage of frozen raw pork. **International Journal of Food Microbiology**, v. 54, p. 19–25, 2000.

FDA, Foods and Drugs Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, 2006. Disponível em <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>. Acesso em: 24 ago, 2007

FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. **Microbes and Infections**, v.2, p. 1651–1660, 2000.

FERNANDEZ, M.M.; MARZI, M.C., BERGUER, P.; BURYZN, D.; LANGLEY, R.J.; PIAZZON, I.; MARIUZZA, R.A.; MALCHIODI, E.L. Binding of natural variants of staphylococcal superantigens SEG and SEI to TCR and MHC class II molecule. **Mol. Immunol.**, v. 43, p. 927, 938, 2006.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia de segurança alimentar**. Trad. de Guimarães, M. C. M. e Leonhardt, C. Porto Alegre. Artmed, 2002.

FRANCO, BDGM; LANGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, P. C. **Microbiologia de los alimentos**. 4 ed., Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1993. 229p.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S.; OLIVEIRA, C. A. F. 1998. Aspectos da qualidade do pescado de relevância em saúde pública. **Revista de Higiene Alimentar**, 12:30-37.

GRANADA, G.G.; MENDONÇA, C.R.B.; PORTO, C.; ROSA, F.; SILVA. E.; SILVA, W.P.; KOETZ, P.R.; ZAMBIAZI, R.C. Hygienic sanitary profile of quindins commercialized in Pelotas/RS. **Alim. Nutr.**, v. 14, n.1, p. 57-61, 2003.

HAMADA SATO, N. et al. Quality assurance of raw fish base on HACCP concept. **Food Control**, v. 16, p. 301-307, 2005.

HATHA, A.A.M.; Lakshmanaperumalsamy, P. Prevalence of Salmonella in fish and crustaceans from markets in Coimbatore, South India. **Food Microbiology**, v.14, p. 111-116, 1997.

HERRERA, F.C et al. Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 527-536, 2006.

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

HUSS, H.H. Assurance of seafood quality. **Fisheries and Aquaculture Department. FAO**, 1997a.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Artmed. São Paulo. 2005.6ª ed.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES F. P; ITO, K. (Eds). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington:Apha, 2001. p. 69-80.

LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins. In: Downes F. P; Ito, K. (Eds). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. **Washington:Apha**, 2001. p. 387-403.

LUND, B.M., 2000. Freezing. In: Lund, B.M., Baird Parker, T.C., Gould, G.W. (Eds.), **The Microbiological Safety and Quality of Food**, vol. I. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, pp. 122–145.

MPA, Ministério da Pesca e Agricultura. Estatísticas da Pesca e Agricultura. Disponível em <http://www.mpa.gov.br/index.php/informacoes-e-estatisticas/estatistica-da-pesca-e-aquicultura>. Acesso em: 27/02/2013.

MUNDUNKUN, M.K.; ANTONY, P.D.; NAIR; N.R. A review on autolysis in fish. **Fisheries Research**, v.4, p. 259-269, 1986.

PETERSON, A. C.; BLACK, J. J.; GUNDERSON, M. F. Staphylococci in Competition. Vol. I: Growth of Naturally Occurring Mixed Populations in Precooked Frozen Foods during Defrost. **Appl Microbiol**, v. 10, p16-22, 1962a.

PETERSON, A. C.; BLACK, J. J.; GUNDERSON, M. F. Staphylococci in Competition. Vol. II: Effect of Total Numbers and Proportion of Staphylococci in Mixed Cultures on Growth in Artificial Culture Medium. **Appl Microbiol**, v. 10, p.23-30, 1962b.

RAJ, H., WIEBE, W.J.; LISTON, J.. Detection and enumeration of fecal indicator organisms in frozen sea foods. **Appl Microbiol**, v. 9, p. 295-303, 1961

RALL, V.L.M.; CARDOSO, K.F.G.; CHAVIER, C. Qualidade microbiológica de pescado comercializado na cidade de Botucatu. **Higiene Alimentar**, v. 25, n. 192/193, p.123-125, 2011.

ROBBINS, R.; GOULD, S., BERGDOLL, M., Detection the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. **Appl. Microbiol.**, v.28, p. 946-50, 1974.

SCHLUNDT, J. New directions in foodborne disease prevention. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 3-17, 2002.

SILVA JR., E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. São Paulo, 1995, 264p.

SIMON, S.S.; SANJEEV, S. Prevalence of enterotoxigenic *S. aureus* in fishery products and fish processing factory workers. **Food Control**, v. 18, p. 1565-1568, 2007.

SIMON, S.S.; SANJEEV, S. Prevalence of enterotoxigenic *S. aureus* in fishery products and fish processing factory workers. **Food Control**, v. 18, p. 1565-1568, 2007.

SIQUEIRA, L. M.; DELÚ, M. A. F; SBAMPATO, C. G.; MENDONÇA, A. T.; Ocorrência de gastroenterites relacionado as à ingestão e manipulação inadequada de alimentos. **Higiene Alimentar**, v.20, n.144, p.34-36, 2006.

THEYS, T. E. et al. Effect of pH, water activity and gel micro-structure, including oxygen profiles and rheological characterization, on the growth kinetics of *Salmonella Typhimurium*. **International Journal of Food Microbiology** Volume 128, Issue 1, 30 November 2008, Pages 67-77.

VIEIRA, R.H.S.F. et al. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado**. São Paulo: Livraria Varela, 2004, 380p.