



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS
MÉDICAS

AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA POR CULTIVO E
METAGENÔMICA DE PEIXES PIRARUCU (*Arapaima gigas*)
SUBMETIDOS A DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE SALGA

Flávia Thamires Barbosa da Silva

Belém – Pará

2017

AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA POR CULTIVO E
METAGENÔMICA DE PEIXES PIRARUCU (*Arapaima gigas*)
SUBMETIDOS A DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE SALGA

Flávia Thamires Barbosa da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. André Salim Khayat.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Assumpção

Belém – Pará

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da Unidade Hospitalar João de Barros Barreto
(UHJBB/EBSERH/UFPA)

Silva, Flávia Thamires Barbosa da, 1993-

Avaliação bacteriológica por cultivo e metagenômica de peixes pirarucu (*Arapaima gigas*) submetidos a diferentes procedimentos de salga. / Flávia Thamires Barbosa da Silva; Orientador, Prof.º Dr.º André Salim Khayat. — 2017.

57 f. : il. ; color. : 30 cm.

Inclui bibliografias.

Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Pará, Núcleo de Pesquisa em Oncologia, Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas, Belém, 2017.

1. Neoplasias gástricas. 2. Nitratos. 3. Peixes. I. Khayat, André Salim, *orient.*
II. Título.

CDD - 23. ed. 616.9943309811

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES E FONTES FINANCIADORAS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Universidade Federal do Pará – UFPA

Núcleo de Pesquisas em Oncologia – NPO

Instituto Evandro Chagas – IEC

Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas – IEC

Laboratório de Genômica Médica – A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, por ter sido minha força e meu guia em todos os momentos dessa árdua caminhada.

À minha família e ao meu namorado Felipe por sempre ter acreditado no meu potencial, terem me apoiado em mais um passo importante da minha vida e não me deixado desistir nos momentos difíceis, até que o mesmo fosse concluído com sucesso, eles foram essenciais para a realização de mais esse sonho.

Aos meus queridos amigos, companheiros de todas as horas, por estarem sempre ao meu lado, principalmente nos momentos em que mais precisei de uma palavra de incentivo para continuar minha jornada.

Ao meu querido Orientador Professor Doutor André Salim Khayat por todos os ensinamentos durante esses 6 anos que tive a honra de ser sua orientanda, pela confiança depositada, pelo companheirismo, pela dedicação e atenção na elaboração desse trabalho, sem as quais não teria conseguido finalizar mais essa etapa.

Ao meu Coorientador Professor Doutor Paulo Assumpção pela colaboração e auxílio na realização desse trabalho e durante todo o meu mestrado.

Aos meus colegas do Núcleo de Pesquisa em Oncologia que, diretamente ou indiretamente, me ajudaram na conclusão de mais essa etapa da minha vida acadêmica, pelo nosso companheirismo diário que deixou essa jornada mais leve e feliz.

A todos, muito OBRIGADO!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

Na região Norte, o câncer gástrico (CG) ocupa o segundo lugar entre os tipos de tumores mais frequentes em homens e o quarto lugar entre as mulheres. Para o ano de 2016, foram estimados 690 novos casos no estado do Pará, sendo 260 casos na capital. O CG tem uma etiologia multifatorial, é resultante da interação de fatores genéticos (endógenos) e ambientais (exógenos). Estudos epidemiológicos têm evidenciado uma associação clara entre o consumo excessivo de alimentos conservados em sal e a ocorrência de CG, isso se deve principalmente à ação cancerígena dos compostos N-nitrosos resultantes da união de produtos da via de redução do Nitrato (oriundo da salga) e de compostos orgânicos presentes na região do estômago. Essa redução é realizada por enzimas bacterianas (nitrato redutase) que estão presentes em espécies contaminantes que podem proliferar nesse tipo de alimento. Tais alimentos conservados em sal, como o pirarucu (entre outros peixes), camarão e charque, estão incorporados há muitos anos no padrão alimentar do estado do Pará e de outras áreas da região amazônica. Durante o processo de salga, o tempo, as condições de processamento, de armazenamento e da comercialização do alimento estão diretamente relacionados com a qualidade destes produtos, por este motivo, ressalta-se a importância de estudos que avaliem condições alternativas de processamento, como o uso da refrigeração, visando atenuar a produção de componentes nocivos a saúde humana. No presente estudo, investigamos a composição bacteriana em diferentes processos de salga destes alimentos, por meio de isolamento bacteriano e metagenômica. Amostras de pirarucu fresco evidenciaram crescimento de *E. coli*, indicando contaminação microbiana de origem fecal, o que não foi percebido nas amostras submetidas a salga. A partir das análises metagenômicas pode-se observar uma abundância do gênero *Staphylococcus* nas amostras de peixes salgados, principalmente naqueles mantidos expostos em temperatura ambiente. Esse gênero contém espécies que causam toxinfecções e possuem a enzima nitrato redutase. A contaminação do pirarucu por essas espécies bacterianas leva a produção de nitrito, que quando consumidos originam a formação de agentes carcinógenos envolvidos na formação de mutações, podendo desencadear as neoplasias gástricas. Embora a refrigeração tenha amenizado o quantitativo bacteriano, o efeito bacterioestático ou bactericida do processo de salga não foi suficiente para manter a qualidade do pescado salgado em níveis adequados para consumo, assim, o consumo do mesmo pode trazer malefícios a saúde da população e estar relacionado com os altos índices de CG na população de Belém e da região Norte.

Palavras-chave: Câncer gástrico, Pirarucu, Salga, Nitrato, Nitrito.

ABSTRACT

In the North region, gastric cancer (GC) ranks second of the most frequent types of tumors in men and fourth in women. For 2016, were estimated 690 new cases in the state of Pará, 260 cases in the capital. GC has a multifactorial etiology, resulting from the interaction of genetic (endogenous) and environmental (exogenous) factors. Epidemiological studies have shown a clear association between the excessive consumption of salt-preserved foods and the occurrence of GC, this is mainly due to the carcinogenic action of N-nitroses compounds resulting from the union of Nitrate reduction pathway (from salting) products and of organic compounds present in the stomach region. This reduction is performed by bacterial enzymes (nitrate reductase) that are present in contaminating species that can proliferate in this type of food. Such salt-preserved foods, such as pirarucu (among other fish), shrimp and charque, have been incorporated for many years into the food pattern of the state of Pará and other areas of the Amazon region. This reduction is performed by bacterial enzymes (nitrate reductase) present in contaminating species that can proliferate in this type of food. Salt-preserved foods, such as pirarucu (among other fish), shrimp and charque, have been incorporated for many years into the food pattern of the state of Pará and other areas of the Amazon region. During the salting process, the time and conditions of processing, storage and commercialization of the food are directly related to the quality of these products. For this reason, the importance of studies that evaluate alternative processing conditions, such as use of refrigeration, in order to mitigate the production of components harmful to human health. In the present study, we investigated the bacterial composition in different salting processes of these foods, through bacterial and metagenomic isolation. Samples of fresh pirarucu evidenced growth of *E. coli*, indicating microbial contamination of fecal origin, which was not noticed in the samples submitted to salting. From the metagenomic analyzes we can observe an abundance of the genus *Staphylococcus* in the samples of salted fish, especially in those kept exposed at room temperature. This genus contains species that cause toxoinfections and have the enzyme nitrate reductase. The contamination of pirarucu by these bacterial species leads to the production of nitrite, which when consumed lead to the formation of carcinogens involved in the formation of mutations, which may trigger gastric neoplasms. Although refrigeration has diminished the bacterial quantitative, the bacteriostatic or bactericidal effect of the salting process was not sufficient to maintain the quality of the salted fish in levels suitable for consumption, therefore, the consumption of the fish can be harmful to the health of the population and be related with high GC rates in the population of Belém and the North region.

Keywords: Gastric cancer, Pirarucu, Salga, Nitrate, Nitrite

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CG – Câncer Gástrico

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

IDA – Índice Diário Aceitável

INCA – Instituto Nacional do Câncer

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

NaCl – Cloreto de Sódio

NOC – Compostos N-nitrosos

WHO – World Health Organization

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	pg
Figura 1: Pirarucu salgado comercializado nas feiras de Belém.....	15
Figura 2: Influências ambientais no processo de carcinogênese gástrica.....	21
Figura 3: Processo de formação dos NOCs.....	22
Figura 4: Organização do armazenamento das amostras de peixes.....	25
Figura 5: Número de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) demonstrando a diversidade dos grupos amostrais.....	34
Figura 6: Índice de diversidade de Shannon demonstrando a diversidade dos grupos amostrais.....	35
Figura 7: Abundância relativa dos principais filos presentes nos grupos amostrais.....	36
Figura 8: Abundância relativa dos principais gêneros presentes nos grupos amostrais	37
Figura 9: Abundância relativa dos principais gêneros presentes no grupo 3, comparando o corte profundo e superficial.....	39
Figura 10: Índice de diversidade de Shannon demonstrando a diversidade dos grupos amostrais, comparando região superficial com região profunda.....	42
Figura 11: Abundância relativa dos principais gêneros presentes no grupo 3, comparando o corte profundo e superficial.	43
Tabela 1: Organização dos grupos amostrais para análise dos dados obtidos a partir do isolamento bacteriano.....	28
Tabela 2: Resultados obtidos na análise bacteriológica por cultivo.....	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Câncer Gástrico e Dieta	10
1.2 Dieta Regional e Alimentos Salgados	12
1.3 Pirarucu: Conservação, Venda e Consumo	13
1.3.1 Microbiota do Pirarucu	15
1.3.2 Bactérias Anaeróbias Facultativas	18
1.4 Metagenômica	19
1.5 Produção de Nitritos e a Carcinogênese Gástrica	20
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3. METODOLOGIA	25
3.1 Coleta, Armazenamento e Transporte das Amostras	25
3.2 Análises Bacteriológicas	26
3.2.1 Pesquisa Molecular das <i>E. Coli</i> Diarreio gênicas	26
3.2.2 Extração de DNA Bacteriano	27
3.2.2.1 PCR Multiplex	27
3.2.3 Pesquisa Molecular dos Vibrios	27
3.3 Análise descritiva	27
3.4 Metagenômica	28
3.4.1 Desenho Amostral	28
3.4.2 Extração de DNA	28
3.4.3 Amplificação, Sequenciamento e Processamento de dados	29
3.4.4 Análises Taxonômicas	30
3.4.5 Análise dos dados	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Análise por isolamento bacteriano	31
4.2 Análise por metagenômica	33
5. CONCLUSÃO	45
6. REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer Gástrico e Dieta

O câncer gástrico (CG) tem uma etiologia multifatorial, em que os tumores se desenvolvem a partir de lesões na mucosa gástrica, é um processo que inclui várias etapas sendo resultado da interação de fatores genéticos (endógenos) e ambientais (exógenos), por um longo período de tempo (CARVALHO et al., 2011).

Estudos têm demonstrado que a dieta é o fator de risco exógeno mais relevante para o desenvolvimento do câncer gástrico (ABNET, 2015; HU, 2015; RESENDE, 2006). A ingestão de alimentos conservados em sal, defumados ou muito condimentados, alimentos ricos em gordura, principalmente saturadas, excesso de consumo de carboidratos aliados a um baixo consumo de fibras provenientes de frutas, verduras e legumes, assim como a baixa ingestão de proteínas, podem contribuir na etiologia desse câncer (KOBAYASHI et al., 2002).

Estudos epidemiológicos têm evidenciado uma associação clara entre o consumo excessivo de alimentos conservados em sal, tais como peixes, vegetais, salsicha, presunto e charque, e o risco de câncer gástrico, sendo possível que os compostos N-nitrosos (NOC), que coexistem nestes alimentos, possam também atuar no processo de carcinogênese gástrica (MENEZES, 2015; KOBAYASHI et al., 2002).

Adicionalmente, uma série de estudos experimentais realizados principalmente por pesquisadores japoneses indicaram que dietas com alimentos com altas concentrações de sal podem lesar a mucosa gástrica e torná-la mais susceptível à ação de carcinógenos químicos (HOWSON et al., 1986). Além de causar gastrite crônica, dietas ricas em alimentos conservados em sal podem facilitar a absorção de carcinógenos químicos, funcionando como promotores do desenvolvimento de tumores em roedores.

Os tumores gástricos se apresentam, predominantemente, na forma de três tipos histológicos: adenocarcinoma (responsável por 95% dos tumores), linfoma, diagnosticado em cerca de 3% dos casos, e leiomiossarcoma, iniciado em tecidos que dão origem aos músculos (INCA, 2016).

Os adenocarcinomas podem ser classificados em dois tipos histológicos distintos: intestinal e difuso, segundo a classificação de Laurén (1965). O tipo intestinal se caracteriza pela presença de lesões ulcerativas, sendo mais comum no antro e na pequena curvatura, apresentando período de latência longo e uma fase pré-clínica prolongada. Este tipo é o mais frequente e mais diferenciado, sendo dependente de fatores ambientais e associadas com a presença de lesões pré-cancerosas, como: metaplasia intestinal e displasia (COTRAN et al, 2000; MAYER, 2001).

O tipo difuso tem evolução mais rápida e se caracteriza por infiltrar rapidamente a parede do estômago (COTRAN et al, 2000; MAYER, 2001). É pouco diferenciado, tem prognóstico ruim, apresenta-se em forma de tumores maiores, geralmente possui um grau de penetração maior na parede gástrica e não está associado a lesões pré-cancerosas (WU, 2006; ZHENG, 2007).

O CG se caracteriza pela ausência de sintomas em sua fase inicial. Indivíduos com tumores mais extensos podem apresentar desconforto epigástrico, sensação de plenitude pós-prandial, dor persistente, anorexia, emagrecimento, anemia ferropriva por perda de sangue, náuseas e vômitos (estes últimos mais comuns em tumores pilóricos). Podem ocorrer metástases em órgãos abdominais ou em linfonodos regionais e supraclaviculares. O principal órgão-alvo para a metástase é o fígado, ocasionando icterícia e aumento do tamanho e da consistência do mesmo (MINCIS, 2008).

O tratamento desta neoplasia é bastante complexo, sendo a cirurgia de retirada do estômago ou de parte dele, juntamente com linfonodos próximos, a única expectativa de cura real (TAKAHASHI et al., 2013; DIKKEN et al., 2012; LIAKAKOS & ROUKOS, 2008; DICKEN et al., 2005). Como tratamento complementar usa-se a quimioterapia ou a radioterapia (CANCER.ORG, 2016).

O prognóstico do paciente é dado pelo estadiamento do tumor, isto é, pelo grau de invasão da parede e dos vasos do órgão, pelo envolvimento de órgãos abdominais, de linfonodos regionais e pelas características do tumor (ZILBERSTEIN, 2013; MORAES & SOUZA FILHO, 1996). Somente 30 a 50% dos pacientes podem ser operados e mesmo os pacientes submetidos à ressecção total, a taxa de recorrência ainda é elevada (HEJNA et al., 2006).

No Brasil, esses tumores aparecem em quarto lugar na incidência entre homens e em quinto entre as mulheres. A estimativa de novos casos no ano de 2016 foi de 20.520 casos, sendo 12.920 em homens e 7.600 em mulheres. Na região Norte, esse tipo de tumor está em segundo lugar entre os mais frequentes em homens e em quarto lugar entre as mulheres, sem considerar câncer de pele não-melanoma. Foram estimados para o ano de 2016, 690 novos casos no estado do Pará, sendo 260 casos na capital (INCA, 2016).

No resto do mundo, dados estatísticos revelam declínio da incidência, especificamente nos Estados Unidos, Inglaterra e outros países mais desenvolvidos. A alta mortalidade é registrada atualmente na América Latina, principalmente na Costa Rica, Chile e Colômbia. Porém, o maior número de casos ocorre no Japão, onde são encontrados 780 doentes por 100.000 habitantes (INCA, 2016).

A identificação de fatores de risco modificáveis, como os fatores alimentares, pode ter um papel importante, não só na elaboração e aplicação de estratégias de prevenção, mas também no impacto na morbidade e mortalidade desse tipo de câncer de mau prognóstico (CHENG et al., 2016).

1.2 Dieta Regional e Alimentos Salgados

No estado do Pará, há um alto consumo de carne vermelha e peixe pela população. Antigamente, havia dificuldades de conservação destes alimentos perecíveis, pelo baixo acesso à energia elétrica e ausência de refrigeradores, a preservação desses alimentos era garantida mediante a adição de sal. Dessa forma, o charque e o peixe salgado acabaram sendo incorporados ao padrão alimentar do estado e de outras áreas da região amazônica, constituindo itens relevantes na alimentação (RESENDE et al., 2006).

Com o passar dos anos o acesso à energia elétrica teve um aumento permitindo o uso de refrigeradores, porém o consumo de alimentos salgados já havia se tornado um hábito alimentar incorporado na sociedade, principalmente nas comunidades ribeirinhas. A alta ingestão de alimentos salgados, além de estar relacionada com os hábitos culturais, também está ligada a falta de informação sobre os danos que o processo de salga pode causar na qualidade dos alimentos, como a produção de carcinógenos (DE ASSUMPCÃO et al., 2016).

Esse padrão de dieta presente na cidade de Belém e em muitas regiões da Amazônia pode ser caracterizado como potencial favorecedor das etapas iniciais do processo de

desenvolvimento do câncer gástrico. Ademais, as agressões contínuas à mucosa gástrica decorrentes da ação irritativa do elevado consumo de alimentos conservados em sal e/ou da ingestão de alimentos em temperatura elevada, podem atuar como facilitadores no processo de invasão da *Helicobacter pylori* e de outros patógenos (D'ELIA et al., 2012; BORNSCHEIN et al., 2011).

1.3 Pirarucu: Conservação, Venda e Consumo.

O Pirarucu (*Arapaima gigas*) é o maior peixe de escama de água doce do mundo, podendo chegar a 4 metros e 250 kg, habita preferencialmente ambientes de águas calmas como grandes lagos e margem de rios, alimenta-se principalmente de peixes de menor porte. Sua reprodução ocorre nos lagos marginais, formados durante o período de cheia nos rios amazônicos (MELO et al., 2005).

A carne fresca do pirarucu é pouco consumida nos grandes centros de comercialização de pescado na Amazônia. Devido ao seu grande porte, o peixe rende várias postas que são salgadas por meio de um processo artesanal de salga e desidratação (IMBIRIBA, 1991). Tradicionalmente, o Pirarucu é comercializado na forma salgada e seca, denominado de “bacalhau brasileiro” e apresenta grande importância econômica na Região Norte do Brasil (LOURENÇO et al., 2002).

A pesca predatória do pirarucu tem reduzido os estoques naturais e tem sido uma grande ameaça para essa espécie. No estado do Pará, o período do defeso começa em primeiro de dezembro, estendendo-se até 31 de maio. Após esse período, a captura, a comercialização e o transporte devem atender às medidas de tamanho mínimo, como 1,50, 1,20 e 1,10 metros de comprimento total, respectivamente, para o peixe inteiro, para manta inteira e para manta seca (IBAMA, 2004).

A salga é um método de preservação baseado na penetração do sal no interior dos tecidos, ocasionado por fatores físicos e químicos, como a difusão e osmose, e uma série de processos bioquímicos associados com mudanças em vários constituintes dos peixes, principalmente as proteínas (SANCHEZ, 1965). Tais processos são observados quando o nível de sal no músculo atinge 8 a 10%, verificando-se a partir desta concentração uma redução da solubilidade das proteínas e da capacidade de retenção de água nos tecidos (LASSEN, 1965).

Segundo Sanchez (1965), o sal não é um preservativo no sentido estrito da palavra, mas sim tem uma ação preservativa, extraindo água ao mesmo tempo em que penetra nos tecidos do músculo do pescado, convertendo estes líquidos em uma solução concentrada de cloreto de sódio, quando há penetração suficiente do sal, as proteínas coaguláveis se estabilizam e os tecidos do peixe se contraem pela perda da água.

Quando o sal comum entra em contato com o músculo do peixe, em suficiente quantidade, paralisa a autólise e a decomposição. Sua ação preservativa consiste na capacidade do cloreto de sódio de produzir uma elevada pressão osmótica nas células bacterianas, dando como consequência o seu rompimento ou plasmólise. Atualmente sabe-se que o sal comum não apenas causa a plasmólise como também bloqueia o núcleo das proteínas, desnaturando as enzimas. Sua ação preservativa se manifesta mediante alterações provocadas na estrutura das proteínas e enzimas, tornando estas substâncias inativas. O cloreto de sódio possui ação bacteriostática e bactericida, ou seja, paralisa o crescimento e causa a morte das bactérias (ZAITSEV, 1969).

Segundo Lourenço et al. (2002), a salga do pirarucu é habitualmente realizada logo após a captura, sendo descamado, eviscerado, manteado na própria embarcação, submetido a uma primeira etapa de salga, sem nenhum critério higiênico-sanitário e tecnológico, também é comum a salga daqueles peixes que não foram comercializados frescos ou ressalgas realizadas por diferentes atravessadores até a comercialização final. A qualidade do peixe salgado está diretamente vinculada a matéria-prima, ao método de salga, ao controle da temperatura e da umidade durante o transporte, entres outros requisitos do processamento (ANVISA, 2007).

Na cidade de Belém, o pirarucu salgado seco é comumente comercializado em feiras livres sem nenhum tipo de embalagem, sobre bancadas de madeira e expostos a altas temperaturas e umidade típicas daquela região, em condições higiênico-sanitárias precárias, embora apresente alto valor comercial (Figura 1). Na maioria dos supermercados o mesmo está acondicionado em bandejas revestido com filme plástico, sobre superfície de fácil higienização (granito, aço inoxidável) e em temperatura climatizada.



FIGURA 1: Pirarucu salgado comercializado nas feiras de Belém (Feira do Ver-o-Peso e Feira da 25 de Setembro, Belém/PA). Fonte: Site www.rotasturisticas.com

Mesmo com o efeito bactericida do sal e menor atividade de água encontrada em pescado salgado, caso os critérios higiênico-sanitários não sejam atendidos durante o processamento e comercialização desse alimento, é possível ocorrer a contaminação e a multiplicação de bactérias indicadoras de má higiene, assim como a proliferação de microorganismos patogênicos (NUNES et al., 2012).

1.3.1 Microbiota do Pirarucu

A variedade da microbiota do peixe está diretamente relacionada com a qualidade da água em que foi realizada a pesca. Quanto mais poluída a água, maior a chance de o pescado ser contaminado e transmitir agentes patogênicos e tóxicos aos consumidores. Outro fator importante para a contaminação é o manejo após a captura, nas fases de processamento e durante o transporte até o destino final (VIEIRA, 2004; JAY, 2005).

Microrganismos normalmente são encontrados nas superfícies externas (brânquias, pele e muco) e nos intestinos de peixes vivos ou recém-capturados (JAY, 2005). Após a morte, a autólise se instala e a superfície do peixe se torna mais permeável a bactérias. Com a liberação de compostos, como: açúcares simples, aminoácidos e ácidos graxos livres, há o estabelecimento de um meio nutritivo para a multiplicação de bactérias, acentuando a decomposição bacteriana (VIEIRA, 2004).

O efeito preservativo da salga é devido principalmente ao declínio da atividade de água, que previne o crescimento de muitos microrganismos deteriorantes, adicionalmente ao efeito tóxico dos íons cloretos (ABEROUMAND, 2010; GOULAS; KONTOMINAS, 2005). Esse efeito pode ser diminuído com a falta de cuidados higiênicos durante a manipulação e a

exposição do produto em locais úmidos, possibilitando a contaminação do pescado por fungos filamentosos e bactérias, reduzindo o seu prazo de validade (VIEIRA, 2004).

Sobre os parâmetros de qualidade regulamentados para a comercialização do pescado salgado a ANVISA estabeleceu através da Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, que deve haver ausência de *Salmonella* spp para 25g de amostra; limite máximo para coliformes termotolerantes de $10^2/g$ de amostra e limite máximo para Staphylococcus coagulase positiva de $5 \times 10^2/g$ de amostra, em cinco amostras de um mesmo lote (ANVISA, 2001). O limite para Clostridium sulfito redutores em pescado é de no máximo $2 \times 10/g$ de amostra, segundo o Decreto Estadual 12.486 de 1978 (SÃO PAULO, 1991).

A presença de grupos coliformes em produtos destinados ao consumo humano é indicativa de contaminação pós-sanitização ou pós-processo, inclusive de natureza fecal, podendo causar desde infecções agudas até crônicas aos consumidores, a exemplo das disenterias (SILVA et al., 1997). A *Escherichia coli* é a principal bactéria do grupo de coliformes termotolerantes. A presença dessa bactéria está relacionada com a contaminação fecal da água do local de pesca e/ou no transporte, manipulação e local de venda (VIEIRA, 2004). Está associada a diarreias, podendo levar a quadros mais graves como: como colite hemorrágica e septicemia (GERMANO & GERMANO, 2001).

As salmoneloses são causadas pelas bactérias do gênero *Salmonella* spp. Essas bactérias têm como principal reservatório o trato intestinal do ser humano e de animais de sangue frio e quente, com exceção de peixes, moluscos e crustáceos, os quais podem vir a se contaminar após a pesca (GERMANO & GERMANO, 2001; VIEIRA, 2004).

As bactérias halofílicas são responsáveis pelas alterações organolépticas (limosidade, mau cheiro e cor avermelhada) no peixe salgado, tratam-se de bactérias gram-negativas, aeróbicas estritas e que necessitam de altas concentrações de sal para suas atividades enzimáticas, para estabilidade da membrana e síntese proteica (FRANCO & LANDGRAF, 2008). Essas bactérias não são consideradas patogênicas, mas produzem alterações que prejudicam o alimento e desagradam os consumidores.

A velocidade de crescimento de cada organismo depende de muitos fatores, o que influencia notavelmente qual vai ser a população que predominará (MOSEL et al., 2003). Esses fatores são classificados em quatro grupos:

- **Fatores intrínsecos:** aqueles que dependem das características do substrato de crescimento, ou seja, do alimento. Incluem: quantidade de água disponível, níveis de nutrientes, pH, presença de substâncias antimicrobianas naturais e estruturas dos tecidos (MOSSEL et al., 2003).
- **Fatores de tratamento ou processamento:** aqueles que são consequências da elaboração dos alimentos, tanto em escala industrial quanto doméstica, como: aquecimento, irradiação, mudanças de pH provocadas pela adição de acidulantes ou de microrganismo que produzem ácidos (MOSSEL et al., 2003).
- **Fatores extrínsecos:** impostos pelo meio exterior, como a temperatura ambiente e a umidade do ar (MOSSEL et al., 2003).
- **Fatores implícitos:** estes dependem da microflora particular dominante que se desenvolve inicialmente em resposta aos outros fatores. Os efeitos implícitos podem ser sinérgicos ou antagônicos (MOSSEL et al., 2003).

O peixe pode ser contaminado por um variado grupo de microrganismos e por resíduos de produtos químicos contidos em águas contaminadas ou poluídas. A contaminação pode estar relacionada com a origem do pirarucu ou pelo processo pós abate, desta forma a falta de medidas higiênicas durante o transporte, manuseio e conservação podem facilitar a contaminação a partir de patógenos presentes no próprio pescado ou provenientes do ambiente (FAO, 2010).

Essas contaminações provenientes do ambiente podem ocorrer pela falta de condições de higiene dos barcos pesqueiros, lavagem com água contaminada, contato com gelo produzido a partir de água de má qualidade, condições de armazenagem e temperatura a qual o peixe fica exposto. Em todas essas etapas a higiene das instalações, qualidade da água e refrigeração são itens fundamentais para a conservação do Pirarucu (ALVES et al., 2002; GERMANO et al., 1993).

Diversos autores reforçam a importância da conservação do pescado em baixas temperaturas, do momento da captura até a comercialização, para impedir que os processos autolíticos se instalem e que ocorra a multiplicação bacteriana responsável pela deterioração do produto. Por isso é essencial a manutenção da temperatura durante todo o processo de transporte, industrialização e comércio do pescado (BRIEN et al., 2006; SATO et al., 2005).

A manutenção da qualidade do pescado está ligada ao tempo, higiene e temperatura. O tempo é importante na rapidez com que se ocorrem reações microbianas, que estão relacionadas com o grau de higiene do barco, estrutura de processamento e da manipulação, aliados às baixas temperaturas que se corretamente aplicadas evitarão ou retardarão as reações que levam a degradação do peixe, inibindo também as contaminações (VIEIRA & SAMPAIO, 2004).

1.3.2 Bactérias Anaeróbias Facultativas

O metabolismo anaeróbico é um processo de respiração que não utiliza oxigênio como receptor de elétrons, podendo utilizar nitrato, sulfato, ferro ou manganês. Esse tipo de metabolismo é exclusivo de procariontes, sendo realizado por uma grande variedade de bactérias e arqueobactérias. Dentre as vias mais conhecidas do metabolismo anaeróbico, temos o processo de redução de nitrato (desnitrificação) e a redução disassimilatória do sulfato (VANDECASTEELE, 2008).

Na ausência de oxigênio, a redução de nitrato passa a ser uma via de produção de energia, esse processo ocorre através da incorporação de íons nitrato que atuam como aceptores de elétrons. Nessa via, os íons nitrato são reduzidos a nitrito e subsequentemente, em óxido nítrico (NO), óxido nitroso (NO₂) e finalmente em nitrogênio molecular (N₂) (BOTHE et al., 2007). Essa redução é executada pela enzima Nitrato-redutase, que é uma enzima do tipo transmembrana, cuja síntese é ativada pelo nitrato e inibida pela presença de oxigênio molecular (VIVIAN et al., 1999).

A maioria das bactérias que realizam esse processo pertence ao filo das proteobactérias e tem a capacidade de utilizar tanto o oxigênio como outros aceptores na respiração, sendo conhecidas com anaeróbias facultativas. Essa característica demonstra a diversidade de mecanismos alternativos de produção de energia desses seres e a sua capacidade de adaptação a vários nichos (BOTHE et al., 2007).

Mais de um terço das bactérias já caracterizadas pertencem ao filo das Proteobactérias, que é considerado o maior e o mais diverso metabolicamente. Esse filo contém a maioria das bactérias que possuem interesse industrial, agrícola e médico. As proteobactérias são gram-negativas, possuem uma ampla diversidade morfológica e diferentes mecanismos de produção de energia (MADIGAN et al., 2016).

A partir da sequência do gene 16S do RNA ribossomal (RNAr), o filo é dividido em 6 classes: Alpha, Beta, Gama, Delta, Epsilon e Zetaproteobacteria. A classe Gama é composta por várias famílias de bactérias importantes para a ciência e para a medicina, tais como as Enterobacteriaceae, Vibrionaceae e Pseudomonadaceae. Os principais representantes dessas famílias são anaeróbios facultativos e utilizam a via de redução do nitrato em seu metabolismo (MADIGAN et al., 2016).

1.4 Metagenômica

Na atualidade, a estratégia mais robusta para estudos microbianos é a metagenômica, que é realizada a partir das tecnologias de sequenciamento de alto-desempenho ou de nova geração (NGS – *Next Generation Sequencing*). Esta revolucionou os estudos de microbiologia por ser uma abordagem que permite analisar os genomas tanto de micro-organismos cultiváveis, como os não-cultiváveis em laboratório, possibilitando o isolamento de DNA a partir de amostras obtidas de diversos ambientes (NESME et al., 2016; SIMON & DANIEL, 2011). Estima-se que menos de 1% dos micro-organismos provenientes de seus distintos habitats podem ser cultivados em condições laboratoriais (KUMAR et al., 2015; TURNBAUGH & GORDON, 2008).

Por estudos metagenômicos é possível realizar a identificação de micro-organismos sem a necessidade de cultivo em laboratório, gerando grandes quantidades de dados que são analisados com o apoio de ferramentas da bioinformática (KUMAR et al., 2015; SIMON; DANIEL, 2011). Para a realização destes, são utilizadas duas abordagens: estudo do gene 16S RNAr e a técnica de *shotgun* ou sequenciamento total (OULAS et al., 2015; MIZRAHI-MAN et al., 2013).

As primeiras abordagens para identificação de microrganismos não-cultiváveis foram baseados em sequenciamentos do gene bacteriano RNAr 16S (TRINGE & HUGENHOLTZ, 2008). O gene 16S RNAr é utilizado como um marcador molecular para caracterizar uma comunidade bacteriana em seus diversos nichos ecológicos. A diversidade é avaliada pela amplificação do gene pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), sequenciamento e comparação com um banco de dados, possibilitando traçar um perfil dessa comunidade (OULAS et al., 2015; VARUZZA, 2013). Isso é possível devido à presença de regiões conservadas nesse gene, que permitem o desenho de *primers* para a amplificação de pelo menos 9 regiões hipervariáveis (V1-V9), por uma análise comparativa de similaridade

destas regiões é possível distinguir e classificar taxonomicamente os micro-organismos presentes em um determinado meio (MIZRAHI-MAN et al., 2013).

1.5 Produção de Nitritos e a Carcinogênese Gástrica

Os carcinógenos genotóxicos são capazes de iniciar a conversão de uma célula normal em célula neoplásica em qualquer tecido e, em nível experimental, a especificidade por determinado órgão parece ser mais uma característica dos carcinógenos epigenéticos do que dos genotóxicos. Entretanto em alguns casos pode haver a distribuição ou a ativação metabólica preferencial do composto genotóxico em determinado órgão ou tecido. Este é o caso dos compostos N-nitrosos (NOC) que podem ser formados no estômago e atuar como iniciadores da conversão neoplásica neste órgão (KYRTOPOULOS, 1989).

Segundo Hwang e colaboradores (1994), a dieta parece estar envolvida nos estágios mais precoces da transformação das células normais em células cancerosas (Figura 2). Os estágios iniciais de gastrite crônica e atrofia parecem ser promovidos pela ingestão excessiva de alimentos conservados em sal, estando os estágios intermediários associados à ingestão de nitratos, nitritos e outros fatores que favorecem a produção intragástrica de nitrosaminas (MAYNE et al., 2001).

O Nitrato e o Nitrito são aditivos utilizados para a conservação de alimentos. O uso de sais de nitrito e nitrato em produtos cárneos já ocorre há bastante tempo, com a evolução das técnicas de conservação alimentar, estes vêm sendo cada dia mais utilizados, pois ajudam a melhorar o sabor e a cor, tem ação preventiva na germinação e proliferação bacteriana, além de serem antioxidantes, ou seja, conseguem aumentar o tempo de conservação do produto (MARTINS & GRANER, 2008)

O uso desses aditivos no processo de salga consegue retardar o processo de oxidação dos lipídios evitando a rancidez, e de desenvolvimento de cor (coloração rósea), devido a formação de nitrosomioglobina (PETENUCCI et al., 2004).

O processo de formação dos NOC se inicia na redução de nitrato em nitrito e leva a formação de agentes nitrosantes. Aproximadamente 25% do nitrato, oriundo da dieta, é recirculado na cavidade oral e 20% dele é convertido em nitrito na superfície da língua, pela ação de bactérias anaeróbias facultativas, esse processo trata-se da síntese endógena (MAGRA et al., 2006). Essa redução realizada por microrganismos também pode ocorrer em

alimentos armazenados à temperatura ambiente, como peixes em processos de salga (Figura 3).

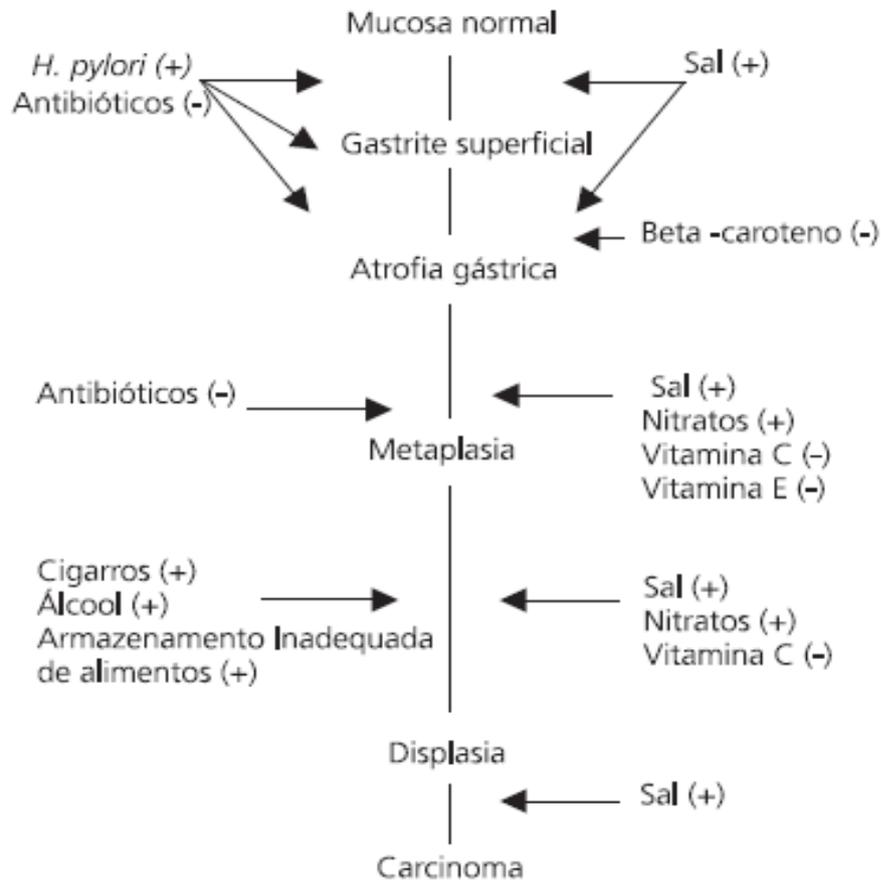


FIGURA 2: Influências ambientais no processo de carcinogênese gástrica.
Fonte: Adaptado de Hwang et al. (1994)

A condição de pH ácido do estômago favorece a formação dos agentes nitrosantes, através da decomposição do Nitrito em Ácido nitroso (HNO_2) e em outros óxidos de nitrogênio. Os substratos (amidas, uréias, amins secundárias e aromáticas) para as reações de nitrosação são oriundos dos alimentos ou formados durante a digestão, e encontram-se em grande quantidade no ambiente estomacal. No estômago, os agentes nitrosantes vão reagir com esses substratos e formar os NOCs, como as nitrosaminas, que são considerados carcinógenos potentes (KREUTZ et al., 2015; GONZÁLEZ; JAKSZYN et al., 2006; ANDRADE, 2004) (Figura 3).

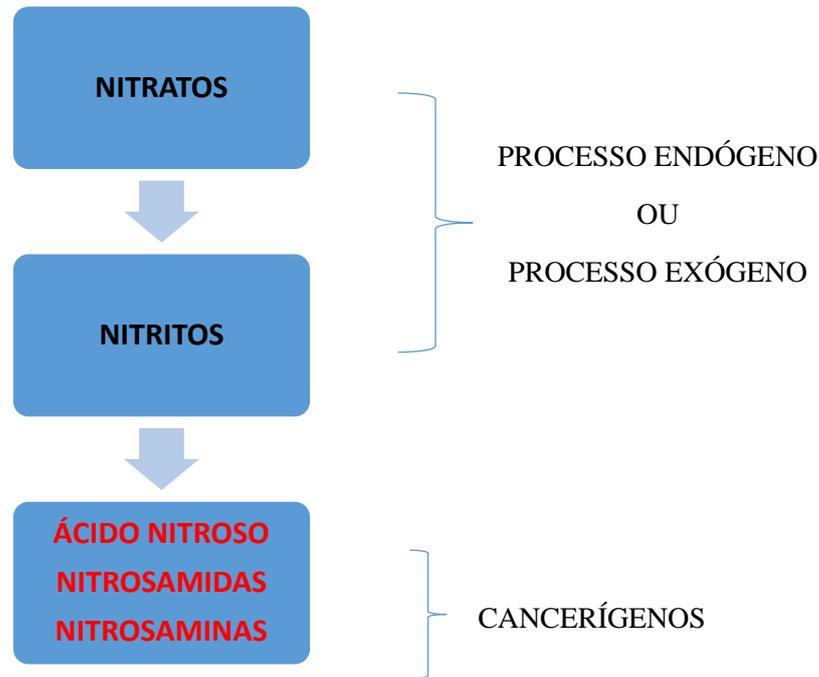


FIGURA 3: Processo de formação dos NOCs. Fonte: Autora.

Vários NOC, tais como nitrosaminas, nitrosamidas e nitrosouréias, têm sido apontados na literatura como possíveis participantes do processo de carcinogênese gástrica (GONZÁLEZ et al., 1994). Foi visto que estes compostos apresentam potente atividade carcinogênica em animais de laboratório. Williams & Weisburger (1991), administraram extratos de peixes e feijões tratados com nitrito, em ratos por via oral, e observaram o surgimento de tumores na porção glandular do estômago, semelhantes aos que ocorrem com maior frequência em seres humanos.

A exposição diária da população, em geral, ao nitrato e nitrito é influenciada tanto pelos hábitos culturais, como pelo estilo de vida e localização geográfica (ANDRADE, 2004). Observou-se que a dieta rica em peixes salgados contribui com valores altos de nitritos, além disso, foi constatado que o consumo de nitrato, dentro dos níveis de ingestão diária aceitável (IDA), combinado com esse tipo de dieta, a qual tem alto teor em aminas precursoras de NOC, leva a formação de nitrosaminas carcinogênicas (VERMEER et al., 1998).

Em 1996, o comitê formado pela Organização Mundial da Saúde e pela Organização de Agricultura e Alimentação das Nações Unidas (WHO - World Health Organization / FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations) estabeleceu uma IDA para nitratos de 3,7 mg/kg de peso corporal (pc) de íon nitrato e 5 mg/kg pc de nitrato de sódio, e para os nitritos de 0,07 mg/kg pc de íon nitrito e 0,08 mg/kg pc de nitrito de sódio, e proibiu o

emprego de nitrito como aditivo em alimentos infantis para crianças menores de três meses. No Brasil, a Portaria nº. 1.004/ ANVISA /MS de 11 de dezembro de 1998, define como limite máximo de 300 mg/kg, para nitrato e 150 mg/kg para nitrito de sódio e potássio em produtos cárneos curados (salgados) industrializados ou frescos, exceto para o charque.

Estudos epidemiológicos sugerem que a alta ingestão de precursores de agentes nitrosantes e a formação intra-gástrica de N-nitrosaminas podem estar associadas com um alto risco de câncer nasofaríngeo, esofágico e gástrico (KIM et al., 2002). Os mecanismos postulados para o aumento do risco do câncer de estômago com o consumo de compostos nitrosos estão associados ao aumento de radicais livres, que promovem lesão celular e redução na produção de muco, um fator de proteção à mucosa gástrica (MAGALHÃES et al., 2008).

O processo de formação de NOCs genotóxicos, que ocorre no estômago, pode ser modulado a partir de componentes da dieta (GOMES-CARNEIRO et al., 1997). Por isso, estudos que avaliem, a partir da análise bacteriológica, a qualidade de alimentos incluídos na dieta da população de nossa região, como o Pirarucu, são de suma importância para se elaborar estratégias para a prevenção do Câncer Gástrico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a composição bacteriológica presentes nas amostras de Pirarucu, levando em conta as condições do processo de salga as quais foram submetidas e o tempo de armazenamento.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar os gêneros e espécies de bactérias presentes no Pirarucu fresco, salgado de forma tradicional (em exposição) e salgado sob refrigeração;
- Identificar as espécies de bactérias redutoras de Nitrato presentes no Pirarucu fresco, salgado de forma tradicional (em exposição) e salgado sob refrigeração.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta, Processamento e Armazenamento das Amostras.

As amostras foram obtidas no município de Breu Branco, localizado aproximadamente a 419 quilômetros da capital Belém. Foram coletados três pirarucus frescos, de cada peixe foram retirados pequenos pedaços (aproximadamente 25 cm³) para serem armazenados, ainda fresco, dentro de tubos Falcon de 50mL, o restante de cada posta do peixe foi destinado ao processo de salga.

Os peixes foram salgados de forma tradicional, adicionando sal aos pedaços, e depois armazenados em sacos plásticos e transportadas em um isopor com gelo. Após o transporte para Belém, as amostras permaneceram sendo processadas da seguinte forma: as amostras frescas foram congeladas, uma amostra de cada peixe salgado foi mantida em geladeira (3 amostras) e outra amostra ficou em exposição a temperatura ambiente (3 amostras) (Figura 4).

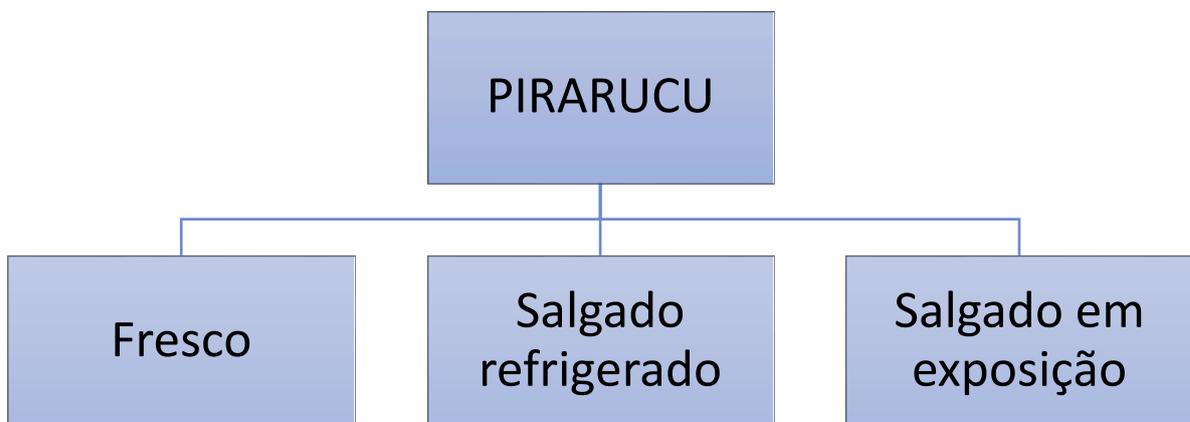


FIGURA 4: Organização do processamento das amostras de peixes.

As amostras foram processadas nas condições do estudo durante 28 dias. No 21^o dia, foi retirado um pequeno fragmento de cada amostra, acondicionada na geladeira e em exposição, para análise bacteriológica. No último dia de armazenamento, repetiu-se o processo de retirada de um fragmento de cada amostra.

Adicionalmente, foram coletados três Pirarucus salgados vendidos em Feiras de Belém (Feira da 25 de Setembro, Feira do Entrocamento e Feira do Ver-o-peso), para realização da análise bacteriológica, fazendo um comparativo entre a salga feita em laboratório e a salga realizadas pelos fornecedores (pescadores). Desses três peixes também foram retirados fragmentos pequenos, posteriormente congelados e encaminhados para análise.

Após o fim do período de processamento/armazenamento todos os fragmentos foram transportados, em condições ideais, para os laboratórios que realizaram as análises: Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas (SABIM) do Instituto Evandro Chagas e Laboratório de Genômica Médica do A. C. Camargo Cancer Center, em São Paulo.

3.2 Análises Bacteriológicas

Sob condições de esterilidade e em capela de fluxo laminar utilizando-se facas e/ou bisturis foi retirado cerca de 25g em média do material e realizado posterior trituração com auxílio de um graal e pistilo para as análises bacteriológicas.

Para identificação de enterobactérias foram empregados métodos de isolamento e caracterização bioquímica. Cerca de 25 gramas do macerado foram adicionadas em 225 ml de Água Peptonada Tamponada (APT pH 7.0), homogeneizada e incubada a 35°C por 18 horas. Para a pesquisa de *Salmonella* uma alíquota (0,1 mL) da cultura em APT foi inoculada em caldo Rappaport - Vassiliadis (RV) e incubada a 42,2 °C por 18 horas. Outra alíquota do APT (0,1 mL) foi inoculada em caldo EC e incubada a 35 °C por 18 horas, visando o isolamento de *E. coli*. Posteriormente, as culturas dos caldos RV e EC foram semeadas em meios seletivos e indicadores: ágar SS e ágar Mac Conkey, respectivamente.

As colônias suspeitas de *Salmonella* e *E. coli*, foram submetidas ao meio de cultura Triplo Açúcar Ferro (TSI) e identificadas bioquimicamente. Para a pesquisa de vibrios foram diluídos 75g das amostras em APA 1%NaCl, APA 3%NaCl e APT e posterior isolamento nos meios SS, MC e TCBS. Cerca de 5 a 10 colônias suspeitas foram semeadas nos meios de triagem TSI e Kligler, seguidas da identificação bioquímica e sorológica.

3.2.1 Pesquisa Molecular das *E. Coli* Diarreiogênicas

As amostras de *E. coli* previamente identificadas bioquimicamente foram cultivadas em ágar nutriente (Difco) à temperatura de 35–37 °C por 18–24 horas. As cepas de referência usadas como controles positivos foram *Escherichia coli*: EPEC E2348/69 (genes *eae* e *bfpA*),

EAEC O42 (gene *aggR*), ETEC H10407 (genes *elt* e *est*), EIEC EDL1284 (gene *ipaH*) e EHEC EDL931 (gene *stx*) e *Escherichia coli* K12 DH5 α como controle negativo.

3.2.2 Extração de DNA Bacteriano

O DNA dos isolados caracterizados fenotipicamente como *E. coli* e das cepas de referência dos controles positivos e negativo foi extraído pelo método de fervura e congelamento, seguindo às recomendações de Baloda et al. (1995).

3.2.2.1 PCR Multiplex

A reação de PCR Multiplex foi realizada a partir de 2 μ L de cada DNA extraído e 23 μ L da solução mix, contendo entre 0,5 a 1,5 μ L de acordo com cada iniciador (Invitrogen, Brasil), 10 mM de dNTP mix dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Invitrogen, Brasil), 0,5 U de Taq DNA polimerase platinum, tampão Taq 1X, 50 mM de MgCl₂ (Invitrogen, Brasil) e água estéril ultra-pura para um volume final de 25 μ L. As reações da PCR multiplex foram colocadas no termociclador automático de gradiente modelo Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems–EUA) e submetidas a ciclos específicos de amplificação que consisti de 1 passo de 2 min a 50 °C (Hot-Start), 1 passo de 5 min. a 95 °C (Desnaturação inicial) seguido por 40 ciclos de 1 s a 95 °C, 50 °C e 72 °C e 1 passo final de extensão de 7 min a 72°C.

Os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com Syber Safe e visualizados sob luz UV com auxílio de um transluminador (Vilber Lourmat, França). Como marcador de tamanho molecular será usado o Ladder de 1 Kb.

3.2.3 Pesquisa Molecular dos Vibrios

A análise molecular foi realizada por PCR através da amplificação dos genes *tdh*, *trh* e *tlh* seguida do sequenciamento na plataforma ABI 3500 (*Applied Biosystems*). As sequências produzidas foram editadas no programa *Sample Manager*, acoplado ao *ABI 3500 DNA Sequencer*.

3.3 Análise Descritiva

Para a avaliação dos resultados obtidos a partir dos isolamentos bacterianos foi realizada uma análise descritiva dos dados, verificando presença ou ausência de crescimento

de colônias das espécies identificadas. Os dados obtidos foram agrupados em 6 grupos: A, B1, B2, C1, C2 e D (Tabela 1).

Grupos	Amostras
A	Peixes Frescos
B1	Peixes Salgados Refrigerados (21 dias)
B2	Peixes Salgados Refrigerados (28 dias)
C1	Peixes Salgados em Exposição (21 dias)
C2	Peixes Salgados em Exposição (28 dias)
D	Peixes comercializados em Feiras

TABELA 1: Organização dos grupos amostrais para análise dos dados obtidos a partir do isolamento bacteriano.

3.4 Metagenômica

3.4.1 Desenho Amostral

Foram utilizadas 9 amostras de Pirarucu para a análise, sendo 3 de peixes frescos, 3 de peixes salgados e refrigerados, e 3 amostras de peixes salgados em temperatura ambiente. E de cada peixe foi gerado mais uma amostra do corte profundo no tecido para a análise comparativa entre superficial e profundo (~1cm), totalizando um número amostral de 18 amostras. Todas as amostras analisadas estavam armazenadas em sua condição específica (refrigerado ou exposição) a 28 dias.

3.4.2 Extração de DNA

As amostras foram colocadas em um período de incubação por 18h em 600 µl de tampão de lise (Qiagen) e 15 µl de proteinase K (20 µg/µl) a 55°C. Após esse período, as amostras de DNA foram extraídas utilizando um protocolo padrão de fenol-clorofórmio, seguido de uma precipitação por etanol. A quantificação foi realizada usando um

espectrofotômetro (Nanodrop-ThermoFisher Scientific) e o DNA foi visualizado em gel de agarose (2%) para verificar sua integridade.

3.4.3 Amplificação, Sequenciamento e Processamento dos dados

A região V4-V5 foi amplificada usando um conjunto de primers projetado para gerar *amplicons* compatíveis com a química disponível para a plataforma Ion Torrent PGM, que permitiu uma sequência de alta qualidade de aproximadamente 400 nucleotídeos (Ion PGM Sequencing 400 Kit). A cobertura do conjunto de primers foi avaliada usando Projeto de Banco de Dados Ribossômico (RDP-Release 11.2), ProbeMatch (COLE et al., 2014), ARB Silva's (Release 115) e Test Prime (KLINDWORTH et al., 2013). O primer forward (5'-AYTGGGYDTAAAGNG-3') e o primer reverse (5'-CCGTCAATTCNTTTRAGTTT-3') correspondiam às posições 562 e 906, respectivamente, do gene RNAr 16S de *Escherichia coli*.

Foram realizadas reações de amplificação, em triplicatas, contendo um volume de 50 µl por amostra, cada uma contendo: 2,5 µM de cada primer, 25 µl do kit Kapa HotStart High Fidelity Master Mix (Kapa Technologies) e 25 ng de DNA genômico (gDNA). As condições de termociclagem foram: 95°C por 3 minutos; 98°C por 15 segundos e 40°C em 30 segundos por 35 ciclos; seguido de uma última etapa de extensão a 72°C por 5 minutos. Os *amplicons* das três reações de cada amostra foram reunidos e purificados usando um kit de purificação por PCR MinElute (Qiagen).

Os produtos purificados foram corridos em géis de agarose a 1,5% e as bandas de gel com intervalo de *amplicons* esperado foi purificado utilizando o kit de extração de gel Qiaquick (Qiagen) para remover artefatos, dímeros de primers e bandas não específicas. *Amplicons* foram “*end-repaired*” e adaptadores com códigos de barras foram ligados. As quantidades equimolares de *amplicons* de cada amostra foram agrupadas, utilizando o kit de quantificação de qPCR Ion Torrent (ThermoScientific, Carlsbad, EUA). Todas as amostras foram sequenciadas na plataforma Ion torrent PGM (ThermoScientific, Carlsbad, EUA).

Para se obter um controle de qualidade no processamento dos dados foram utilizadas diversas ferramentas computacionais, conforme as etapas a seguir:

- **Conversão para FASTAq:** As milhões de leituras (reads) geradas foram convertidas para o formato FASTAq. Nos arquivos gerados se encontravam todas as sequências identificadas e suas respectivas sequências de qualidade

codificada em ASCII. O SRAtoolkit (LEINONEM et al., 2010), software que permite acesso aos dados no formato SRA, além de os converter para diversos formatos, foi empregado para a conversão dos reads gerados de SRA para FASTAq.

- **Verificação da qualidade das bases:** Após o sequenciamento foi importante verificar a qualidade dos reads gerados. Para tanto o FastQC (TRIVEDI et al., 2014) foi utilizado, nele é possível verificar a qualidade média dos nucleotídeos por posição nos reads, além de outras métricas que ajudam a inferir sobre a qualidade do sequenciamento.
- **Remoção de adaptadores:** remoção de possíveis adaptadores contaminantes.
- **Poda:** É comum em sequenciamentos que as últimas bases dos reads tenham uma queda na qualidade de leitura, nestes casos, foram removidas da análise essas bases para evitar erros de interpretação nos dados, para isso foram utilizados programas específicos que excluem dos reads as últimas bases que possuíam qualidade abaixo do desejado.
- **Filtragem:** Para evitar erros no processo de alinhamento, reads de baixa qualidade deveriam ser excluídos. Filtrou-se os reads de forma que permaneçam apenas aqueles cujas bases atinjam uma qualidade média mínima. Para as etapas de remoção de adaptadores, poda e filtragem o Trimmomatic (BOLGER et al., 2014), foi utilizado.

3.4.4 Análises Taxonômicas

Para o alinhamento foi utilizado o software Diamond (BUCKFINK et al., 2014). Uma anotação não redundante de transcritos de microrganismos foi obtida do Ensembl (www.ensembl.org) e indexada pelo Diamond. Posteriormente o Diamond foi utilizado para mapear os reads (BlastX) utilizando a anotação indexada.

Uma vez que todas as amostras foram mapeadas no software Diamond, os arquivos resultantes foram introduzidos no software de análises metagenômicas MEGAN, versão 6 (HUSON et al., 2011). No software MEGAN foi feita a identificação taxonômica das bactérias encontradas em cada amostra.

3.4.5 Análise dos dados

Na avaliação dos resultados obtidos a partir do sequenciamento, os dados foram agrupados em 3 grupos: A, B e C. O grupo A é formado pelas amostras de peixe frescos; grupo B pelas amostras dos peixes que foram salgados e mantidos refrigerados e o grupo C pelas amostras dos peixes que foram salgados em exposição. Na análise estatística foi utilizado o teste de Wilcoxon para comparar diferenças médias entre os grupos amostrais para Filo, gênero, OTUs e abundâncias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise por isolamento bacteriano

A partir da análise dos isolamentos bacterianos pode-se observar uma maior variedade de espécies bacterianas no grupo A que é composto por peixes frescos. As amostras desse grupo apresentaram crescimento de várias espécies que pertencem ao filo Proteobacteria, a família Enterobacteriaceae, entre elas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sp*, *Edwardisella hoshinae*, *Proteus sp*, etc (Tabela 2).

A família Enterobacteriaceae é um grande grupo de bactérias bastonetes gram negativos distribuídos nos mais variados ambientes, algumas espécies que pertencem a essa família fazem parte da microbiota intestinal de humanos e animais de sangue quente. São patógenos humanos bem comuns e algumas espécies têm grande importância clínica como a *Klebsiella pneumoniae*, o *Enterobacter cloacae* e a *Salmonella spp* (NORDMANN et al., 2011).

Essas bactérias podem se disseminar rapidamente entre humanos, através de água e alimentos contaminados. Fisiologicamente, são capazes de fermentar glicose com produção de gás, reduzir nitrato, catalase positivo, oxidase negativa e não formam esporos. As enterobactérias são responsáveis por muitas infecções que afetam uma grande variedade de hospedeiros (NORDMANN et al., 2014; LITTLE et al., 2012).

	Grupo A	Grupo B1	Grupo B2	Grupo C1	Grupo C2	Grupo D
<i>E.coli</i>	X					
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Enterobacter sp</i>	X	X	X	X	X	
<i>Proteus sp</i>	X					
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	X	X				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	X					
<i>Burkholderia cepacia</i>	X					
<i>Enterobacter aerogenes</i>	X	X				
<i>Providencia rettgeri</i>	X					
<i>Providencia alcalifaciens</i>	X					
<i>Cedecea davisae</i>		X				
<i>Citrobacter freundii</i>						X
<i>Raoutella ornithinolytica</i>	X	X		X		

TABELA 2: Resultados obtidos na análise bacteriológica por cultivo.

Uma das principais espécies dessa família é a *Escherichia coli*, que foi observada em todas as amostras do grupo A (Tabela 2). Essa espécie não faz parte da microbiota natural de peixes, por isso sua identificação é essencial para a avaliação das condições higiênico-sanitárias do processamento e da qualidade da água do local da pesca (VIEIRA et al.; GUZMÁN et al., 2004).

A presença dessa espécie nos alimentos deve ser avaliada sob dois ângulos: indica contaminação microbiana de origem fecal e, portanto condições sanitárias insatisfatórias; e outro aspecto a ser considerado é a patogenicidade de diversas linhagens aos seres humanos. A pesquisa de *Escherichia coli* auxilia na detecção do real risco de uma infecção tóxica alimentar por meio da água e dos alimentos consumidos (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

A partir dos resultados obtidos também foi observado a ausência das espécies *E. coli*, *Proteus sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Citrobacter freundii* nos grupos amostrais compostos pelas amostras de peixes salgados (Tabela 2), esse dado mostra que o processo de salga teve o efeito bactericida esperado sobre essas espécies, independente da condição de armazenamento.

Porém, o processo de salga não foi eficiente para impedir a proliferação de *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter sp*, que estiveram presente nos grupos compostos por amostras de peixes salgados, armazenados em refrigeração e em temperatura ambiente. Essas espécies podem ser encontradas em peixes contaminados através da manipulação em condições inadequadas de higiene e nos que vivem em ambientes aquáticos contaminados (QUINN et al., 2005).

O grupo composto por amostras de peixes comercializados em feiras apresentou proliferação da espécie *Klebsiella pneumoniae*, demonstrando que mesmo o peixe estando em contato com sal por um tempo prolongado não houve efeito bactericida sobre essa espécie, e que a mesma conseguiu se proliferar melhor que as outras espécies nas condições oferecidas pelo substrato. Este dado também foi observado no grupo C1 e C2 compostos pelas amostras salgadas em temperatura ambiente que mimetizam o peixe comercializado em Belém.

4.2 Análise por Metagenômica

Para a análise da diversidade bacteriana dos grupos amostrais estudados foram utilizados os seguintes parâmetros: Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs), o Índice de diversidade de Shannon, a Abundância relativa de filos e gêneros.

As Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) referem-se aos aglomerados de organismos, agrupados por similaridade de sequência de DNA de um gene marcador taxonômico específico. As sequências podem ser agrupadas de acordo com a sua similaridade, e as unidades taxonômicas operacionais são definidas com base no limite de similaridade (geralmente 97% de similaridade). Normalmente, as OTUs são baseadas em sequências de RNAr 16S similares (PYLRO, 2014).

O gráfico Box Plot desenhado a partir dos dados obtidos sobre o número de OTUs demonstrou uma baixa diversidade taxonômica no grupo C, estatisticamente significativa com um $p=0.001$ (Figura 5). Isso pode estar relacionado com a presença de uma superpopulação de

um gênero, provavelmente com ação patogênica, que teve a capacidade de inibir o crescimento de outros gêneros bacterianos, diminuindo assim a diversidade desse grupo amostral.

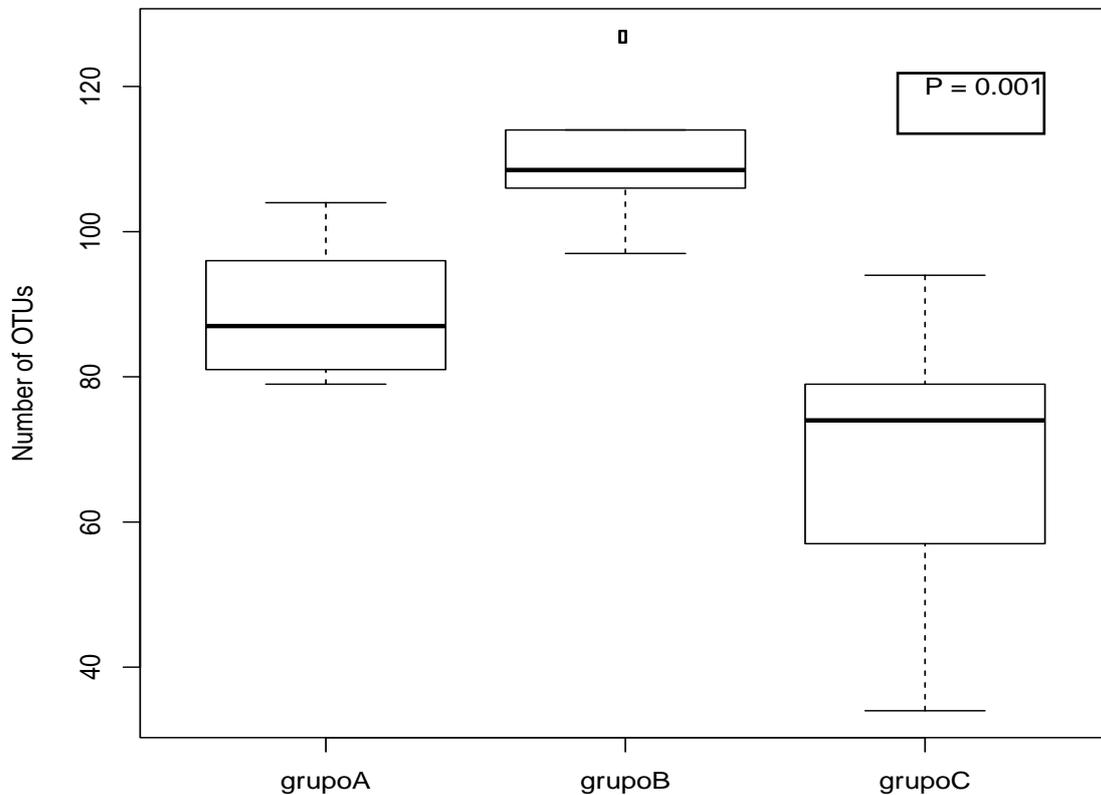


FIGURA 5: Número de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) demonstrando a diversidade dos grupos amostrais.

Outro parâmetro utilizado foi o índice de diversidade de Shannon (H), é um dos índices comumente usado para caracterizar a diversidade de espécies em uma comunidade. Os índices de diversidade fornecem mais informações sobre a composição da comunidade do que a simples riqueza de espécies (ou seja, o número de espécies presentes); eles também consideram a abundância relativa de diferentes espécies (MELO, 2008). O valor aumenta quanto maior o número de espécies, o valor é zero se houver apenas uma espécie na amostra, e será maior quanto maior o número de espécies (PYLRO, 2014).

O Índice de diversidade de Shannon demonstrado no gráfico Box Plot evidenciou uma baixa diversidade de espécies no grupo C em relação aos outros dois grupos, com diferença estatisticamente significativa, $p < 0.001$ (Figura 6).

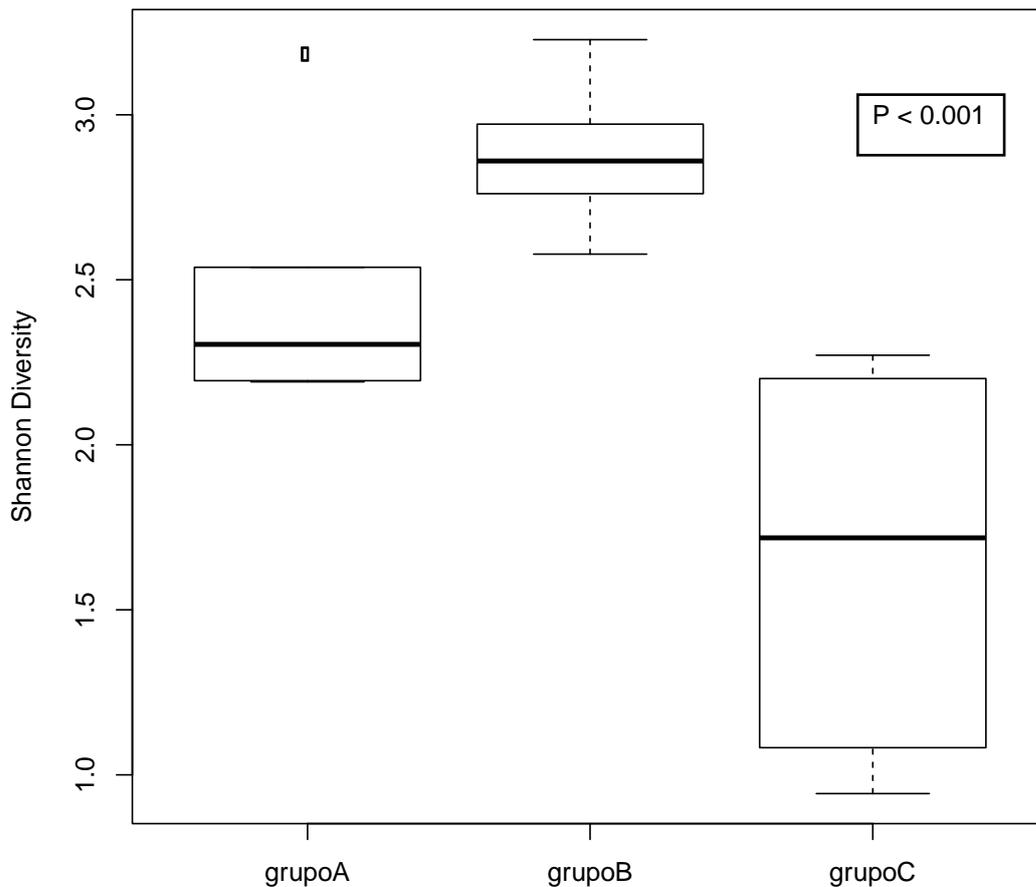


FIGURA 6: Índice de diversidade de Shannon demonstrando a diversidade dos grupos amostrais.

Os dados obtidos pelo software MEGAN forneceram a organização taxonômica da microbiota presente nas amostras. Os resultados mostraram que as amostras de peixes frescos (grupo A) possuem uma maior variabilidade de filos quando comparadas aos outros grupos amostrais, apresentando uma abundância relativa do filo Proteobacteria, como observado no isolamento bacteriano realizado a partir das amostras, e também do filo Bacteroidetes.

Porém, a abundância do filo Bacteroidetes foi diminuída após o processo de salga, sendo que no grupo C, onde as amostras foram salgadas e mantidas em temperatura ambiente, a presença desse filo foi quase nula. Quanto ao filo Proteobacteria, o processo de salga sob refrigeração não influenciou nesse grupo bacteriano, todavia no processamento salga em temperatura ambiente essa população foi reduzida significativamente (Figura 7). Esses dados mostram que a salga, principalmente realizada em temperatura ambiente, teve o resultado esperado sobre as espécies desses filos, como as enterobactérias.

A diminuição da presença do filo Proteobacteria observada na análise metagenômica está de acordo com os resultados apresentados a partir do isolamento bacteriano, onde também foi demonstrada a eliminação, por meio do processo de salga, de espécies deste filo que estavam presentes no peixe fresco.

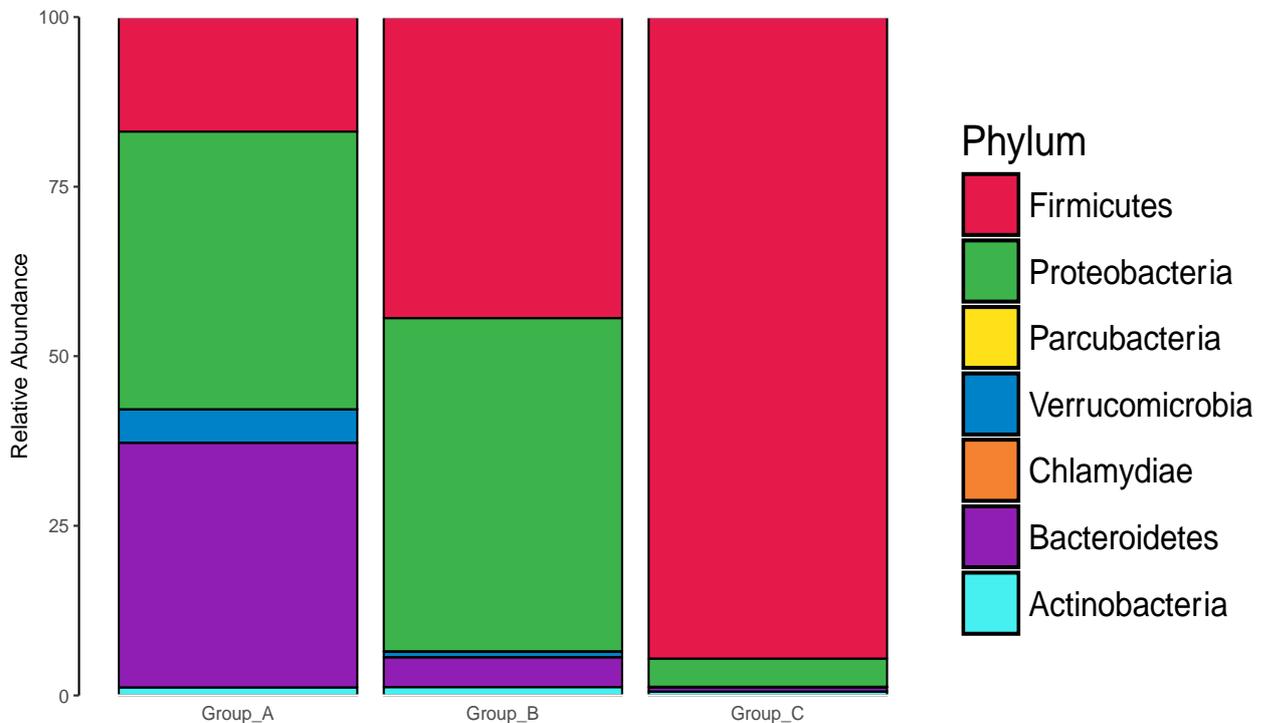


FIGURA 7: Abundância relativa dos principais filos presentes nos grupos amostrais.

Nas amostras de peixes salgados (grupo B e C) ocorreu um aumento da presença do filo Firmicutes quando comparadas ao grupo de peixes frescos (grupo A). Porém, no grupo de peixes salgados em exposição (grupo C) a presença do filo Firmicutes foi relativamente mais abundante (Figura 7). O filo Firmicutes é formado pelas classes Bacilli, Clostridia e Mollicutes, entre os gêneros mais conhecidos estão *Bacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Lactobacillus*, *Clostridium* e *Mycoplasma* (MORAES et al., 2014).

Esse aumento da abundância do filo Firmicutes no grupo C se deve ao aumento da abundância relativa do gênero *Staphylococcus*, um importante representante desse filo, nas amostras salgadas em exposição. Além disso, a diminuição da presença do filo Proteobacteria, além de estar relacionada com o efeito bactericida do processo de salga sobre as espécies, também está ligado à proliferação de uma superpopulação de *Staphylococcus* que conseguiu proliferar mais nas condições oferecidas e inibir o crescimento de outras espécies. A competição entre as espécies presente nesse alimento faz com que uma espécie se multiplique

de forma mais eficaz, levando em contas as condições do mesmo e a características da espécie, ocasionando a destruição das demais (FREITAS & FIGUEIREDO, 2000).

Em relação à abundância relativa dos principais gêneros presentes nos grupos amostrais, pode se observar que o grupo A apresentou uma maior variabilidade de gêneros, também concordando com os resultados do isolamento bacteriano, enquanto que nos outros grupos pode-se observar a predominância do gênero *Staphylococcus*, principalmente no grupo amostral C (Figura 8).

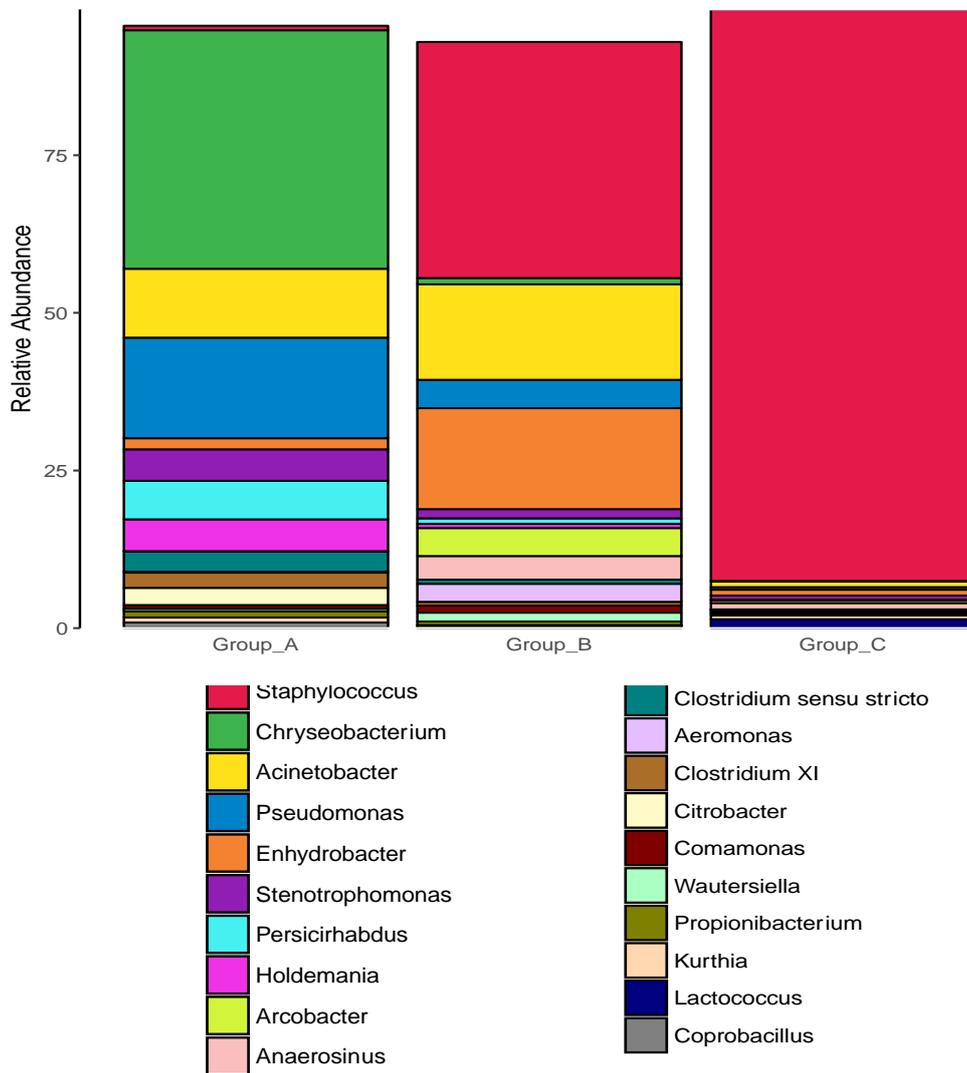


FIGURA 8: Abundância relativa dos principais gêneros presentes nos grupos amostrais.

A predominância do gênero *Staphylococcus* nos grupos B e C (Figura 8), formados pelas amostras de peixes salgados, demonstrou que o processo de salga não teve o efeito bactericida esperado sobre esse gênero e que o quantitativo desse tipo bacteriano aumentou independente da condição de armazenamento (refrigerada ou exposição). Embora a presença

do gênero no grupo B tenha sido menor (40,7%) que no grupo C (92%), a refrigeração não conseguiu evitar a proliferação, apenas amenizá-la. Cabe ressaltar que a frequência desse gênero no grupo A era de apenas 1%.

A abundante presença desse gênero se deve a capacidade de tolerância a concentrações de sal (NaCl), as bactérias deste gênero são tolerantes a concentrações de 10 a 20% de NaCl, mesmo que o processo de salga contenha aditivos como o nitrato, essa capacidade torna os alimentos salgados veículos potenciais para as mesmas (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

O grupo C, formado pelas amostras que ficaram em exposição durante o processo, teve uma abundância muito superior (92%) do gênero *Staphylococcus* quando comparado ao grupo B (40,7%) (Figura 8). A maior contaminação nas amostras que ficaram em exposição está relacionada com o fato de que as bactérias desse gênero possuem uma temperatura ótima de multiplicação de 30 a 37°C (GATTI-JÚNIOR, 2011).

As bactérias desse gênero, principalmente *Staphylococcus aureus*, tornam-se bom competidores em ambientes com concentrações salinas acima do encontrado na matéria-prima, pois a diminuição da capacidade de crescimento de outras bactérias faz com que haja maior oferta de nutrientes para o seu crescimento no substrato (SENIGALIA, 1999). Essa característica aliada à temperatura de exposição ocasionou uma alta proliferação desse gênero, resultando na abundância dele no grupo C.

A partir da análise das amostras do grupo C, comparando região profunda com a superficial, foi possível observar a abundância do gênero *Staphylococcus* em todas as amostras independente da região, demonstrando uma uniformidade na composição bacteriológica desse grupo amostral (Figura 9). É importante ressaltar que nesse trabalho as amostras do grupo C mimetizam o Pirarucu consumido pela população, e esse resultado mostra que a limpeza superficial ou a lavagem do peixe que vai ser consumido não vai impedir que o consumidor ingira as espécies desse gênero.

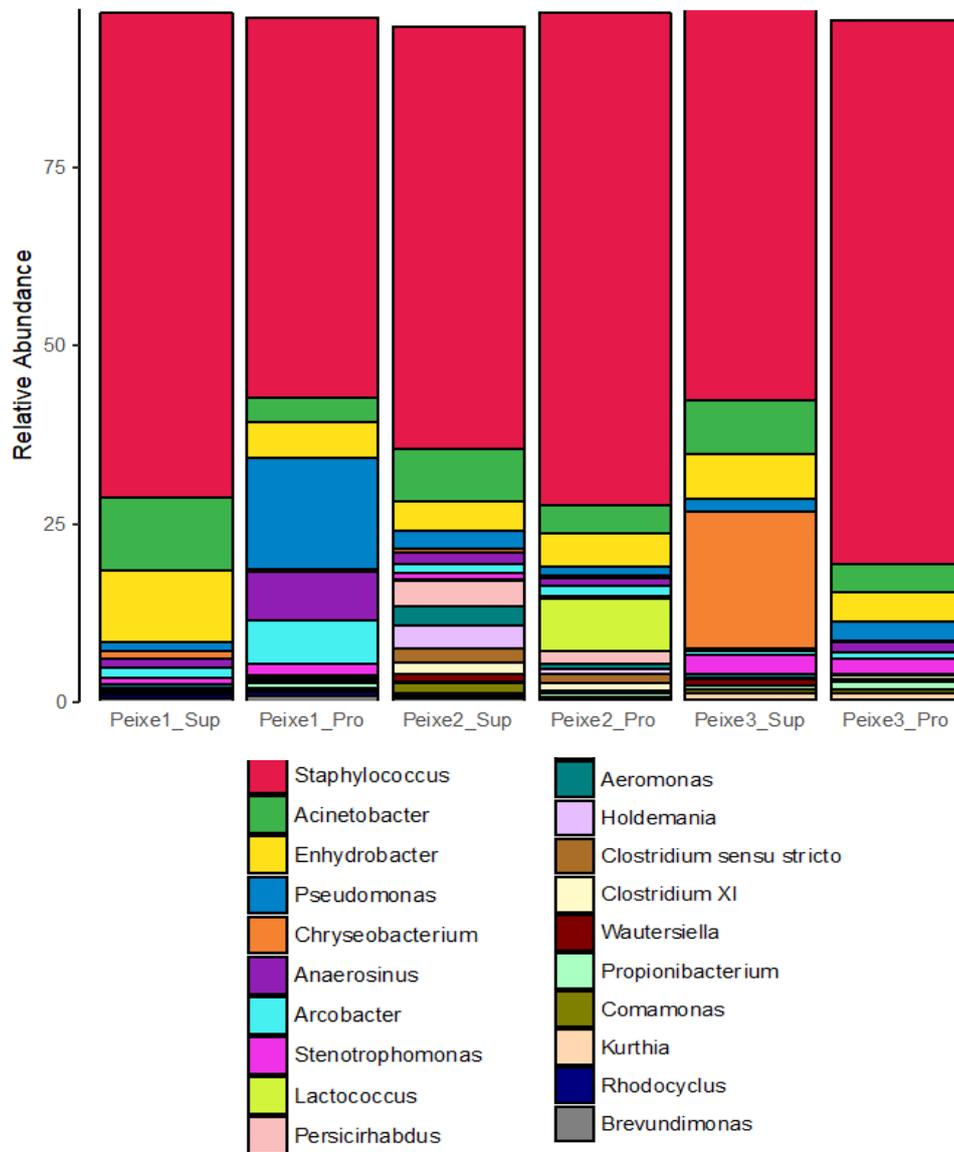


FIGURA 9: Abundância relativa dos principais gêneros presentes no grupo 3, comparando o corte profundo e superficial.

O gênero *Staphylococcus* é responsável por aproximadamente 45% das toxinfecções no mundo, cuja contaminação pode ocorrer durante os estágios de produção ou estocagem do alimento, por cepas de origem ambiental ou humana. Em condições favoráveis, como aquecimento ou refrigeração com temperatura inadequada, este microrganismo cresce e pode produzir toxinas, que podem ser controladas desde que se observem as boas práticas sanitárias de higiene nos estágios de obtenção, produção, estocagem e manuseio de alimentos (FRANCO & LANDGRAF, 2008; CUNHA-NETO et al., 2002).

Entre as espécies desse gênero, o *Staphylococcus aureus* é um dos agentes patogênicos mais envolvidos em surtos e casos esporádicos de intoxicação estafilocócica (CÂMARA, 2001). Essa espécie pode estar presente na poeira, no esgoto, na água, nos alimentos ou equipamentos de processamento de alimentos e nas superfícies expostas aos ambientes, porém os humanos e animais são os principais reservatórios. Alimentos que precisam de muita manipulação em seu processamento e preparo, e que permanecem por um tempo prolongado em temperatura ambiente são considerados de alto risco para esse tipo de intoxicação (FORSYTHE, 2013; AYULO et al., 1994).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são anaeróbias facultativas, tem a capacidade de fazer a redução bioquímica dos nitratos levando à formação de nitritos, e passam a usar essa via de redução para a produção de energia. Esta redução é facilmente realizada por enzimas bacterianas (nitrato redutase) de espécies contaminantes em alimentos, como também pode ser realizada na cavidade oral por bactérias da microbiota local (NASCIMENTO et al., 2008; BOTHE et al., 2007).

As N-nitrosaminas, resultantes da união de produtos da via de redução do Nitrato e de aminas secundárias presentes na região do estômago, apresentam atividade carcinogênica, mutagênica, teratogênica e embriopática (JIN et al., 2012; ZARRINGHALAMI et al., 2009). Os compostos nitrosos, como as nitrosaminas, são agentes alcalinos capazes de reagir com o DNA dos tecidos alvos para alterar suas bases e pode, portanto, iniciar a carcinogênese (CROSS & SINHA, 2004). O composto nitrosodimetilamina possui a capacidade de transferir um grupo metila para um nitrogênio ou oxigênio de uma base de DNA, alterando, dessa maneira o código de instruções para a síntese de proteínas na célula (BAIRD, 2002).

Estudos toxicológicos são desenvolvidos desde 1956, quando Magee e Barnes relataram pela primeira vez a indução de tumores hepáticos em ratos alimentados com ração contendo nitrosodimetilamina (NDMA). Em seres humanos, estudos relatam que as N-nitrosaminas também podem levar ao aparecimento de câncer de estômago, isso também se deve pela formação desse componente ocorrer especificamente no estômago proporcionando um maior contato das células locais com esse agente carcinógeno (BETTA et al, 2016; BAIRD & CANN, 2011; MAYNE et al., 2001).

A via de redução do nitrato à nitrito leva a formação de compostos nitrosos no estômago que ao se combinar com as altas concentrações de radicais livres diminuem a

proteção gástrica, lesionando as células da mucosa do estômago e conseqüentemente favorecendo o aumento dos casos deste tipo de câncer (GARÓFOLO et al., 2004). Quando a parede do estômago se encontra lesionada, o mesmo tende a ficar mais vulnerável a atuação de substâncias carcinogênicas de origem química (RESENDE, 2006).

De Assumpção et al. (2016) demonstrou a partir da quantificação de nitrito que o Pirarucu salgado comercializado nas feiras de Belém tem maior concentração de nitritos em relação ao peixe fresco, e que a lavagem tradicionalmente realizada antes do consumo não proporciona uma diminuição significativa dos níveis de nitritos. Esse dado mostra que esse tipo de alimento, também objeto do presente estudo, bastante consumido pela população local é uma grande fonte de nitritos que quando reduzidos levará a formação de compostos N-nitrosos carcinogênicos.

O grupo C desse estudo, composto pelas amostras salgadas em exposição e armazenadas em temperatura ambiente, mimetiza as amostras comercializadas em feiras, e teve uma alta abundância do gênero *Staphylococcus*, compostos por bactérias que podem ter um papel essencial nesse processo de redução levando a produção de nitritos. A grande quantidade de nitritos no pirarucu comercializado em feiras já demonstrada em outros trabalhos estaria diretamente relacionada com a contaminação desses peixes por bactérias redutoras de nitrato, como observado no presente estudo.

A partir da avaliação do Índice de diversidade de Shannon nos grupos amostrais, comparando corte profundo e corte superficial, no grupo C foi observada uma baixa diversidade na análise do corte superficial, com um $p = 0,03$, demonstrando a predominância de um gênero na superfície dessas amostras (Figura 10).

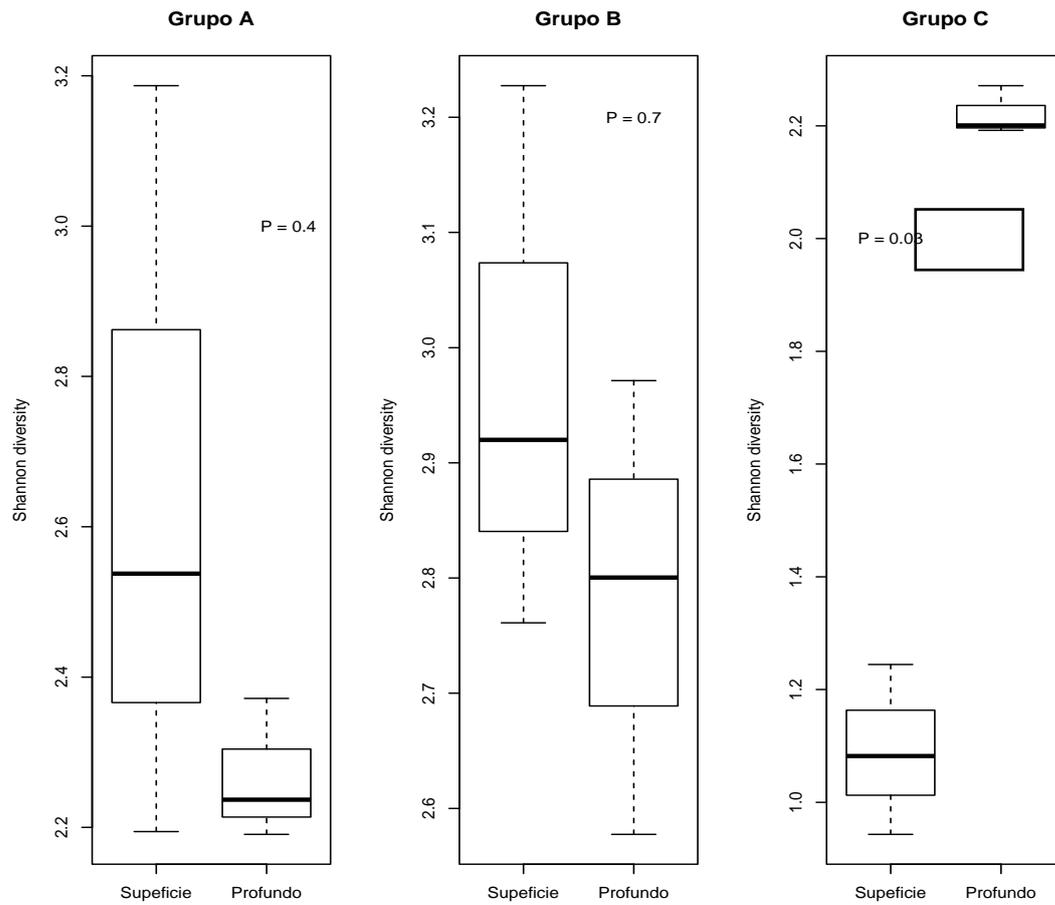


FIGURA 10: Índice de diversidade de Shannon demonstrando a diversidade dos grupos amostrais, comparando região superficial com região profunda.

Na análise da abundância relativa nos grupos, comparando região profunda e superficial, B e C foram observados resultados parecidos com abundância do gênero *Staphylococcus* nas duas regiões. Quanto aos outros gêneros encontrados nesses grupos também não foi visto uma grande diferença entre a comparação das regiões (Figura 11).

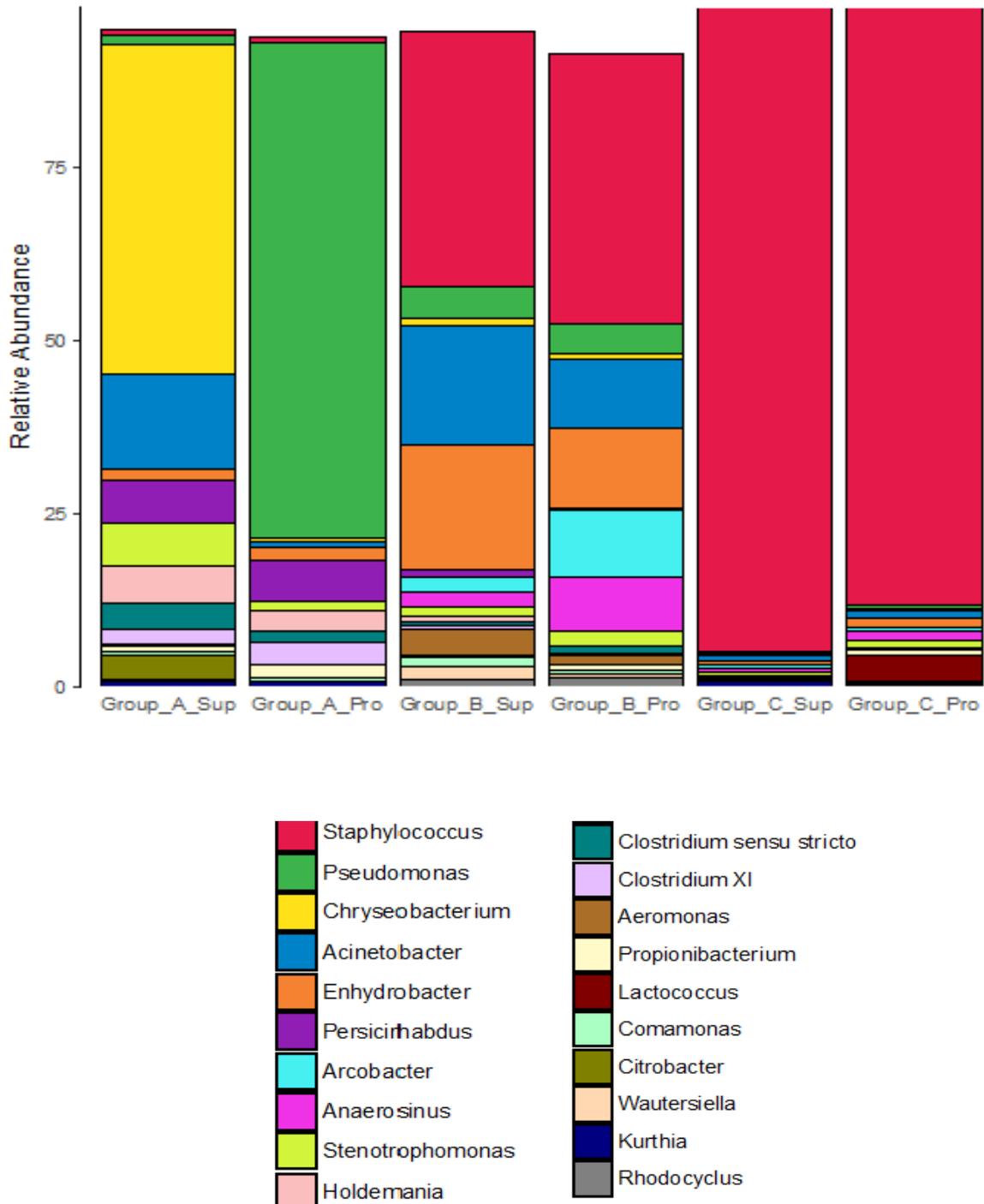


FIGURA 11: Abundância relativa dos principais gêneros presentes nos grupos amostrais.

A partir desses dados que comparam região profunda com a região superficial, foi possível observar uma uniformidade na composição bacteriológica entre as regiões nos grupos B e C, mostrando que a contaminação pelo gênero *Staphylococcus* também ocorreu a nível profundo nas amostras e não só superficialmente, que seria considerado a área mais fácil para ocorrer a contaminação, a partir de manuseio, contato com superfícies contaminadas e etc.

Este dado reforça que a limpeza superficial ou a lavagem do peixe antes de ser consumido não é capaz de impedir que o consumidor entre em contato com espécies patogênicas desse gênero.

No grupo A foi observado uma diferença na composição bacteriana entre a região superficial e a profunda. Na região superficial observou-se uma abundância relativa do gênero *Chryseobacterium* e na região profunda o gênero mais abundante foi *Pseudomonas*. A abundância de *Pseudomonas* se deve ao fato desse gênero possuir espécies que fazem parte da microbiota natural do peixe, e que também agem como decompositoras aumentando sua proliferação logo após a morte. A ação dessas bactérias altera a composição do peixe e produzem aroma desagradável característico do processo de deterioração (ARAÚJO et al., 2010),

O gênero *Acinetobacter*, que também está envolvido na deterioração do pescado, foi observado no grupo A na região superficial e no grupo B nas duas regiões, demonstrando que o processamento em refrigeração não impediu que bactérias decompositoras proliferassem. Enquanto que no grupo C não foi observado a proliferação dessas bactérias, reafirmando o potencial do processo de salga em temperatura ambiente na conservação do peixe, ou seja, a salga tradicional consegue retardar o processo de decomposição e conservar o peixe por um tempo prolongado sem que o mesmo estrague.

5 CONCLUSÃO

O efeito bactericida do processo de salga conseguiu inibir a proliferação de enterobactérias diminuindo as chances de ocorrência de infecções gastrointestinais ocasionadas por essas espécies bacterianas após o consumo desse alimento, e também inibiu bactérias decompositoras retardando a deterioração do pescado, porém não foi suficiente para manter a qualidade adequada do pescado, pois como demonstrado nesse estudo a salga não conseguiu evitar a proliferação do gênero *Staphylococcus* que possui espécies que podem ser patogênicas, causando toxinfecções, e que também tem a capacidade de reduzir nitratos a nitritos, levando a produção de agentes carcinógenos, como o ácido nitroso e nitrosaminas, que estão diretamente relacionados com o processo de carcinogênese gástrica.

No que concerne a estratégia de refrigeração durante o processo de salga, este apresentou o benefício de reduzir a presença do filo Firmicutes que contém bactérias, como as do gênero *Staphylococcus*, que são atuantes na via de redução de nitrato, tendo por hipotética consequência, a diminuição de riscos de mutação e de efeitos relacionados às etapas iniciais da carcinogênese.

Por fim, evidenciamos que a constituição bacteriana do pirarucu salgado de maneira tradicional, disponibilizado comercialmente, embora tenha redução de agentes causadores de quadros gastrointestinais, podem trazer uma carga bacteriana responsável pela origem de elementos notoriamente carcinogênicos. Deste modo, o processamento, a conservação e comercialização deste alimento devem ser realizados em condições higiênicas satisfatórias, e o seu consumo deve ser feito com cautela, visando reduzir os malefícios ao consumidor, como problemas de ordem neoplásica a médio ou longo prazo.

6 REFERÊNCIAS

ABEROUMAND, A. **The effect of water activity on preservation quality of fish**, A review article. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, v. 2, n. 3, p. 221 – 225. 2010.

ABNET, C. C.; CORLEY, D. A.; FREEDMAN, N. D. & KAMANGAR, F. Diet and upper gastrointestinal malignancies. *Gastroenterology*, v. 148, n. 6, p. 1234-1243. e4, 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Resolução RDC nº12. 2 de janeiro de 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Comercialização do Pescado Salgado e Pescado Salgado Seco: Cartilha Orientativa**. 2007.

ALVES, C. L.; CARVALHO, F. D. L.; GUERRA, C. G. & ARAÚJO, W. M. Comercialização de pescado no Distrito Federal: avaliação das condições. *Hig. aliment*, v. 16, n. 102/103, p. 41-49, 2002.

ANDRADE, R. **Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de nitrato e nitrito e N-nitrosaminas em produtos cárneos**. 2004. 201f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

ARAÚJO, D.A.F.V., SOARES, K.M.P. GÓIS, V.A. Características gerais, processos de deterioração e conservação do pescado. *PUBVET*, Londrina, V. 4, N. 9, Ed. 114, Art. 771, 2010.

AYULO, A. M. R., MACHADO, R. A., & SCUSSEL, V. M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, v. 24, n. 1-2, p. 171-178, 1994.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 622 p. 2002.

BAIRD, C. & CANN, M. **Química Ambiental**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, p884. 2011.

BARTSCH, H.; OHSHIMA, H.; PIGNATELLI, B. & CALMELS, S. Human exposure to endogenous N-nitroso compounds: quantitative estimates in subjects at high risk for cancer of the oral cavity, oesophagus, stomach and urinary bladder. *Cancer Surveys*, 8:335-362. 1989.

BETTA, F. D., PEREIRA, L. M., SIQUEIRA, M. A., VALESE, A. C., DAGUER, H., et al. A sub-minute CZE method to determine nitrate and nitrite in meat products: An alternative for routine analysis. **Meat Science**, v. 119, p. 6268, 2016.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, Bjoern. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

BORNSCHEIN, J.; ROKKAS, T.; SELGRAD, M. & MALFERTHEINER, P. Gastric cancer: clinical aspects, epidemiology and molecular background. **Helicobacter**, 16(s1), 45-52. 2011.

BOTHE, H.; FERGUSON, S.J.; NEWTON, W.E. **Biology of the nitrogen cycle**. Amsterdam, Cost, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. ANVISA. Portaria nº 1.004 de 11 de dezembro de 1998. **Regulamento Técnico de Atribuição de Função de Aditivos e seus limites máximos para carne e produtos cárneos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 de mar. 1999.

BUCHFINK, B.; XIE, C.; HUSON, D. H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nature methods**, v. 12, n. 1, p. 59-60, 2015.

CALMELS, S.; OHSHIMA, H.; VINCENT, P.; GOUNOT, A-M. & BARTSCH, H. Screening of microorganisms for nitrosation catalysis at pH 7 and kinetic studies on nitrosamine formation from secondary amines by E.coli strains. **Carcinogenesis**, 6:911-915. 1985.

CÂMARA, S. A. V. **Surtos de Toxinfecções Alimentares no Estado de Mato Grosso do Sul, 1998-2001**. Monografia (Especialização em Saúde Pública) - Escola de Saúde Pública Dr. Jorge David Nasser, Campo Grande. 2001.

CANCER.ORG. **What is stomach cancer**. Disponível em <<https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/about/what-is-stomach-cancer.html>> Acessado em 08. Set. 2016.

CARVALHO, J.B.; SALGADO, N.A.; SILVA, A.C.M.; RAMOS, E.M.L.S.; DEMACHKI, S.; ARAÚJO, M.S. Fatores de risco socioambientais e nutricionais envolvidos na carcinogênese gástrica. **Rev. para. Med.**; 25(2/3) abr.-set. 2011.

CHENG, X. J.; LIN, J. C. & TU, S. P. Etiology and prevention of gastric cancer. **Gastrointestinal tumors**, v. 3, n. 1, p. 25-36, 2016.

COLE, J. R., WANG, Q., FISH, J. A., CHAI, B., MCGARRELL, D. M., SUN, Y., et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D633-D642, 2013.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. O trato gastrintestinal. In: ROBBINS, S. (ed). **Patologia estrutural e funcional**. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 6ª edição. 2000.

CROSS, A. J. & SINHA, R. Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. **Environ Mol Mutagen**, v. 44, n. 1, p. 44-55, 2004.

CUNHA-NETO, A.; SILVA, C.G.M.; STAMFORD, T.L.M. Staphylococcus enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciên. Tecnol. Alim.**, Campinas, v.22, n.3, 2002.

DE ASSUMPTÃO, C. B.; NASCIMENTO, J. L.; KHAYAT, A. S., KHAYAT, B. M., & MOREIRA-NUNES, C. A. Nitrite Levels Before and after Washing in Salted Fish. **Archives of Clinical Gastroenterology**. 2 (1): 007-009. DOI: 10.17352/2455, 2283(007). 2016.

D'ELIA, L.; ROSSI, G.; IPPOLITO, R.; CAPPUCCIO, F. P. & STRAZZULLO, P. Habitual salt intake and risk of gastric cancer: a meta-analysis of prospective studies. **Clinical nutrition**, 31(4), 489-498. 2012.

DICKEN, B. J.; BIGAM D.L.; CASS C. MACKAY J.R.; JOY AA.; HAMILTO S. M. **Gastric adenocarcinoma Review and considerations for Future Directions**. Ann surg,; 241(1):27-39. 2005.

DIKKEN, J.L.; VAN DE VELDE C. J.; COIT D. G.; SHAH M. A.; VERHEIJ M.; CATS A. Treatment of rectable gastric cancer. **Therapeutic advances in gastroenterology**; 5(1):49-69. 2012.

FAO. Farming the waters for people and food. Proceedings of the Global Conference on Aquaculture. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/015/i2734e/i2734e.pdf>>, 2010.

FAO/WHO. Joint Expert Committee on Food Additives FAO/WHO. **Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food.** WHO Food Additives Series 35, Geneva, WHO, 1996.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos.** 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FRANCO, B & LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Atheneu, p. 29. 2008.

FREITAS, A. C., & FIGUEIREDO, P. **Conservação de alimentos.** Livro de apoio a disciplina Conservação de alimentos. Lisboa, 2000.

GARÓFOLO, A., AVESANI, C. M., CAMARGO, K. G., BARROS, M. E., SILVA, S. R. J., TADDEI, J. A. D. A. C., & SIGULEM, D. M. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.17, n.4, p.491-504, out/dez. 2004.

GATTI-JUNIOR, P. **Qualidade higiênica e sanitária de tilápias provenientes de cultivo, comercializadas no varejo.** Dissertação de Mestrado, Centro de Aqüicultura, UNESP, 47 p., Jaboticabal, 2011.

GERMANO, P.M.L.; OLIVEIRA, J.C.F. & GERMANO, M.I.S. O pescado como causa de toxinfecções bacterianas. **Revista de Higiene Alimentar.**, v.7, n.28, p.40-44, 1993.

GERMANO, P.M.L. & GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos.** São Paulo: Varela, 2001.

GOMES-CARNEIRO, M. R. G.; RIBEIRO-PINTO, L.F.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico: a visão do toxicologista. **Cadernos de Saúde Pública**, 13 (supl.1):27-38. 1997.

GONZÁLEZ, C.; PERA, G.; AGUDO, A.; BUENO-DE-MESQUITA, H.; CEROTI, M.; BOEING, H.; SCHULZ, M.; DEL GUINDICE, G.; PLEBANI, M.; et al. Fruit and vegetable intake and the risk of stomach and oesophagus adenocarcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC–EURGAST). **International journal of cancer**, v. 118, n. 10, p. 2559-2566, 2006.

GONZÁLEZ, C.A.; RIBOLI, E.; BADOSA, J.; BATISTE, E.; CARDONA, T.; PITA, S.; SANZ, J.M.; TORRENT, M.; AGUDO, A. Nutritional factors and gastric câncer in Spain. **American Journal of Epidemiology**, 139:466-473. 1994.

GOULAS, A. E. & KONTOMINAS, M. G. Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. **Food Chemistry**, n. 93, p. 511 – 520, 2005.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S. & TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, 126(1), 131-138. 1982.

GUZMÁN, M. C.; BISTONI, M. D. L. A.; TAMAGNINI, L. M.; GONZÁLEZ, R. D. Recovery of *Escherichia coli* in fresh water fish, *Jenynsia multidentata* and *Bryconamericus iheringi*. **Water Research**, v.38, n.9, p.2368-2374, 2004.

HEJNA, M.; WOHRER S.; SCHMIDINGER M.; RADERER M. Postoperative chemotherapy for gastric cancer. **Oncologist**; 11(2):136-45. 2006.

HOWSON, C.P.; HIYAMA, T.; WYNDER, E. L. The decline in gastric cancer:epidemiology of an unplanned triumph. **Epidemiologic Reviews**, 8:1-27. 1996.

HU, J.; LA VECCHIA, C.; NEGRI, E.; DE GROH, M.; MORRISON, H., et al. Macronutrient intake and stomach cancer. **Cancer causes & control**, v. 26, n. 6, p. 839-847, 2015.

HUSON, D. H.; MITRA, S.; RUSCHEWEYH, H. J.; WEBER, N. & SCHUSTER, S. C. Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. **Genome research**, v. 21, n. 9, p. 1552-1560, 2011.

HWANG, H.; DWYER, J.; RUSSELL, M. Diet, *Helicobacter pylori* infection, food preservation and gastric cancer risk: Are there new roles for preventive factors?. **Nutrition Reviews**, 52:75-83. 1994.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. Instrução Normativa nº 34, de 18 de junho de 2004. Aprova as normas gerais para o exercício da pesca do pirarucu (*Arapaima gigas*) na Bacia Hidrográfica do Rio Amazonas e proíbe anualmente a captura, a comercialização e o transporte do

pirarucu. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 22 jun 2004, Seção 1, p. 74.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA – INCA/ Ministério da Saúde. **Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro; 126p. 2015.

IMBIRIBA, E.P. Potencial de criação de pirarucu, Arapaima gigas, em cativeiro. **Acta Amazônica**. Manaus: INPA, v. 31, n. 2, p. 299-316. 2001.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre. Artmed. Cap 6. P 119-130. 2005.

JAKSZYN, P.; BINGHAM, S.; PERA, G.; AGUDO, A.; LUBEN, R.; WELCH, A.; ET AL. Endogenous versus exogenous exposure to N-nitroso compounds and gastric cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST) study. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 7, p. 1497-1501, 2006.

JIN, S. K.; Y. J. KIM; J. H. PARK; I. C. HUR; S. H. NAM; D. SHIN. Effects of purplefleshed sweet potato (*Ipomoea batatas* Cultivar Ayamurasaki) powder addition on color and texture properties and sensory characteristics of cooked pork sausages during storage. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 25, p.1329-1337. 2012.

KIM, H. J., CHANG, W. K., KIM, M. K., LEE, S. S., & CHOI, B.Y. Dietary factors and gastric cancer in Korea: A case-control study. **International journal of cancer**, 97(4), 531-535. 2002.

KLINDWORTH, A., PRUESSE, E., SCHWEER, T., PEPLIES, J., QUAST, C., HORN, M., & GLÖCKNER, F. O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 1, p. e1-e1, 2012.

KOBAYASHI, M.; TSUBONO, Y.; SASAZUKI, S.; SASAKI, S. & TSUGANE, S. Vegetables, fruit and risk of gastric cancer in Japan: A 10-year follow-up of the JPHC study Cohort I. **International journal of cancer**. v. 102, n. 1, p. 39-44, 2002.

KONO S & HIROHATA T. **Nutrition and stomach cancer**. **Cancer Causes and Control**. 7(1):41-55. 1996.

KREUTZ, D. H.; WEIZENMANN, M.; MACIEL, M. J. & DE SOUZA, C. F. V. Avaliação das Concentrações de Nitrato e Nitrito em Hortaliças Produzidas em Cultivos Convencional e Orgânico na Região do Vale do Taquari–RS. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 2, 2015.

KUMAR, S.; KRISHNANI, K. K.; BHUSHAN, B. & BRAHMANE, M. P. Metagenomics: retrospect and prospects in high throughput age. **Biotechnology research international**, v. 2015, 2015.

KYRTOPOULOS, S. A. N-nitroso compound formation in human gastric juice. **Cancer Surveys**, 8:423-442. 1989.

LASSEN, S. - Technological problems in heat treatment of fish requiring more knowledge from fundamental research, In Kreuzer, R. Ed. **The Technology of Fish Utilization**, London, Fishing News, 1965.

LAURÉN P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**,; 64:31-49. 1965.

LEDERER, J. **Alimentação e câncer**. 3.ed. Editora Manole. São Paulo. 1990.

LEINONEN, R.; SUGAWARA, H.; SHUMWAY, M. & INTERNATIONAL NUCLEOTIDE SEQUENCE DATABASE COLLABORATION The sequence read archive. **Nucleic acids research**, v. 39, n. suppl_1, p. D19-D21, 2010.

LIAKAKOS, T. & ROUKOS D.H. More Controversy than Ever – Challenges and Promises Towards Personalized Treatment of Gastric Cancer. **Annals of Surgical Oncologic**; 15 (4) 956–960. 2008.

LITTLE, M. L.; QIN, X.; ZERR, D. M. & WEISSMAN, S. J. Molecular diversity in mechanisms of carbapenem resistance in paediatric Enterobacteriaceae. **International journal of antimicrobial agents**, v. 39, n. 1, p. 52-57, 2012.

LOURENÇO, L.F.H.; AMANAJÁS, C.C.; SOUSA, A.; VIEIRA, L.L. Pirarucu salgado consumido em Belém tem baixa qualidade. **J Beira Rio**. Belém (PA): UFPA, 16 de junho de 2002.

MADIGAN, M.T.; Martinko, J. M.; BENDER, K.S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D.A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAGALHÃES, L.P.; OSHIMA, C.T.F.; SOUZA, L.G.; LIMA, J.M.; CARVALHO, L; FORONES, N.M. Variação de peso, grau de escolaridade, saneamento básico, etilismo, tabagismo e hábito alimentar pregresso em pacientes com câncer de estômago. **Arq Gastroenterol**. 45. (02). 2008.

MAGEE, P.N. & BARNES, J.M. Carcinogenic N-nitroso compounds. **Advances in Cancer Research**, v.10, p.164-246, 1967.

MAGRA, T. I., BLOUKAS, J. G., FISTA, G. A. Effect of frozen and dried leek on processing and quality characteristics of Greek traditional sausages. **Meat Science**. v. 72, 2006, p. 280-287.

MARTINS, O. A. & GRANER, C. A. F. Determinações espectrofotométricas dos íons nitrito e nitrato em sais de cura. **PUBVET**, Londrina, v. 2, n. 18, p. 129-156, 2008.

MAYER, R. J. Câncer do trato gastrointestinal. In: BRAUNWALD, E.; FAUCI, A.S.; KASPER, D.L.; HANSEN, S.L.; LONGO, D.L.; JAMESON, J.L. (ed). **Harrison- Medicina Interna**. M Graw Hill Interamericana do Brasil Ltda. Rio de Janeiro. 16ª edição. 2001.

MAYNE, S.T. RISCH, H.Á.; DUBROW, R.; CHOW, W.; GAMMON, M.D.; VAUGHAN, T.L. Nutrient intake and risk of subtypes of esophageal and gastric cancer. **Cancer Epidemiol Biom Prevention**. 10(10): 1055-62. 2001.

MELO, A. S. O que ganhamos “confundindo” riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade?. **Biota Neotropica**. Vol. 8, n. 3 (jul./set. 2008), p. 21-27, 2008

MELO, C.E.; LIMA, J.D.; MELO T.L. & PINTO-SILVA V. **Peixes do rio das Mortes: identificação e ecologia das espécies mais comuns**. Cuiabá: Unemat. 147 p. 2005.

MENEZES, G. L.; RODRIGUES, R. L.; NASCIMENTO, H. F.; LOPES, A. R.; SOARES, W. C.; et al. Aplicações da Biologia Molecular no Diagnóstico de *Helicobacter Pylori*: Revisão da Literatura. **SAÚDE & CIÊNCIA EM AÇÃO**, v. 1, n. 1, p. 132-140, 2016.

MINCIS, M.; MINCIS, R.. **Câncer gástrico**. Ed. Moreira jr. São Paulo, 2008.

- MIZRAHI-MAN, O.; DAVENPORT, E. R.; GILAD, Y. Taxonomic Classification of Bacterial 16S rRNA Genes Using Short Sequencing Reads: Evaluation of Effective Study Designs. **PLOS ONE**, v.8, n.1, 1 jul. 2013.
- MORAES, A. C. F., DA SILVA, I. T., DE ALMEIDA-PITITTO, B. & FERREIRA, S. R. G. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismo e modulação dietética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 58, n.4, p. 317-327, jun. 2014.
- MORAES, M. F. & SOUZA FILHO, O. Câncer gástrico. **Princípios de Cirurgia Oncológica**. In: MORAES, M. F (Ed). Atheneu. São Paulo. 1996.
- MOSSEL, D.A.A., GARCÍA, B.M., STRUIJK, C.B. **Microbiología de los alimentos**. 2 ed. P 89-98. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. 2003.
- NASCIMENTO, T. S. D., PEREIRA, R. O. L., MELLO, H. L. D. D., & COSTA, J. Methemoglobinemia: from diagnosis to treatment. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 58, n. 6, p. 651-664, 2008.
- NESME, J.; ACHOUAK, W.; AGATHOS, S. N.; BAILEY, M.; BALDRIAN, P.; BRUNEL, D.; et al. Back to the future of soil metagenomics. **Frontiers in microbiology**, v. 7, 2016.
- NORDMANN, P.; NAAS, T. & POIREL, L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791, 2011.
- NORDMANN, P. & POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 9, p. 821-830, 2014.
- NUNES, E. S. C. L., FRANCO, R. M., MÁRSICO, E. T., NOGUEIRA, E. B., NEVES, M. S., SILVA, F. E. R. Indigenous bacteria and pathogens in salted and dried Pirarucu (*Arapaima gigas* Shing, 1822) traded in Belém city, Pará. **Revista Brasileira de Ciências Veterinária**., v. 19, n. 2, p. 98-103, maio/ago. 2012.
- O'BRIEN, S. J.; GILLESPIE, I. A.; SIVANESAN, M. A.; ELSON, R.; HUGHES, C. & ADAK, G. K. Publication bias in foodborne outbreaks of infectious intestinal disease and its implications for evidence-based food policy. England and Wales 1992–2003. **Epidemiology & Infection**, v. 134, n. 4, p. 667-674, 2006.

OULAS, A.; PAVLOUDI, C.; POLYMENAKOU, P.; PAVLOPOULOS, G. A.; PAPANIKOLAOU, N.; KOTOULAS, G.; ARVANITIDIS, C.; ILIOPOULOS, I. Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. **Bioinformatics and Biology insights**, v. 9, p. 75, 2015.

PETENUCCI, M.E.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V. Nitratos e Nitritos na conservação de carne. **Revista Nacional de Carne**, São Paulo, v. 333, p 1-2, 2004.

PYLRO, V. S., ROESCH, L. F. W., MORAIS, D. K., CLARK, I. M., HIRSCH, P. R., & TÓTOLA, M. R. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **Journal of microbiological methods**, v. 107, p. 30-37, 2014.

QUINN, P. J., MARKEY, B. K., CARTER, M. E., DONNELLY, W. J. & LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

RESENDE, A.L.S.; MATTOS, I.E.; KOIFMAN, S. Diet and gastric cancer: historical aspects associated with dietary patterns in the state of Pará, Brazil. **Revista de Nutrição**, Campinas, 19(4):511-519, jul/ago., 2006.

SANCHEZ, J.T. & LAM, R.C. **Principios tecnicos de salado y secado del pescado**; estudio quimico de el sal en el litoral, La Punta, Institui del Mar del Peru, p. 3 – 37. 1965.

SANCHEZ, J.T. & LAM, R.C. - **Tecnologia del salado y secado artificial de la Merluza (Merluccius gayi peruannus)** Callau, Instituto del Mar del Peru, p. 3 – 31. 1973.

SATO, N.H.; USUI, K.; KOBAYASHI, T.; IMADA, C. & WATANABE, E. Quality assurance of raw fish based on HACCP concept. **Food control**, v. 16, n. 4, p. 301-307, 2005.

SÃO PAULO, Estado. **Código Sanitário**. Decreto 12.486, de 20 de outubro de 1978. São Paulo: IMESP. 4ª ed. P 167-168. 1991.

SENIGALIA, S. W. B. **Estudo da presença de *Staphylococcus aureus* em charque e sua capacidade de sobreviver durante o processamento**. 1999. 71 f. Dissertação (Mestrado)-Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1999.

SGABIERI, V.; CÂNDIDO, L.M.B.; STEDEFELDT, E. S. **Alimentação e câncer: fatores de indução e/ou promoção da carcinogênese**. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Campinas. São Paulo. 1992

SILVA, N.; JUNQUEIRA V. C. A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2.ed., 229 p., São Paulo: Varela, 2001.

SIMON, C. & DANIEL, R. Metagenomic analyses: past and future trends. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1153-1161, 2011

TAKAHASHI T.; SAIKAWA Y.; KITAGAWA Y. **Gastric cancer: current status of diagnosis and treatment** *Cancers* (Basel); 5(1):48-63. 2013.

TAKEZAKI T, HIROSE K, INOUE M, HAMAJIMA N, YATABE Y, MITSUDOMI T, et al. Dietary factors and lung cancer risk in Japanese, with special reference to fish consumption and adenocarcinomas. **British Journal of Cancer**; 84(9):1199-206. 2001.

TRINGE, S. G.; HUGENHOLTZ, P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 5, p. 442-446, 2008.

TRIVEDI, U. H.; CÉZARD, T.; BRIDGETT, S.; MONTAZAM, A.; NICHOLS, J.; BLAXTER, M. & GHARBI, K. Quality control of next-generation sequencing data without a reference. **Frontiers in genetics**, v. 5, 2014.

TURNBAUGH, P. J.; GORDON, J. I. An Invitation to the Marriage of Metagenomics and Metabolomics. **Cell**, v. 134, n. 5, p. 708–713, 5 set. 2008.

VANDECASTEELE, J. P.; MONOT, F. Biodegradation of monoaromatic and chloroaromatic hydrocarbons. **Petroleum microbiology: concepts, environmental implications, industrial applications**, v. 1, p. 240-339, 2008.

VERMEER, I. T.; PACHEN, D. M.; DALLINGA, J. W.; KLEINJANS, J. C.; VAN MAANEN, J. M. Volatile N- nitrosamine formation after intake of nitrate at the ADI level in combination with an amine rich diet. **Environment Health Perspect**, v. 106, n. 8, p. 459-463, 1998.

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

VIEIRA, R.H.S.F. & SAMPAIO, S.S. Emprego de gelo nos barcos de pesca, p.37-44, in Vieira, R.H.S.F. (org.), **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. Varela Editora e Livraria Ltda., 380 p., São Paulo, 2004.

VIVIAN, C.M.; CABELLO, P.; LUQUE, M.M.; BLASCO, R.; CASTILLO, F. Prokaryotic nitrate reduction: Molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 21, p. 6573-6584, 1999

WILLET MC. Diet, nutrition and avoidable cancer. **Environmental Health Perspectives**. 103(Suppl 8):S165-70. 1995.

WILLIAMS, G. M. & WEISBURGER, J. H. Chemical carcinogens. In: Casarett & Doull's Toxicology. **The Basic Science of Poisons** (M. O. Amdur, J. Doull & C. D. Klaassen, eds.), 4th ed., pp. 125-200, New York/St Louis/San Francisco: McGraw-Hill Inc. 1991.

WORLD CANCER RESEARCH FUND. **Food, nutrition and prevention of cancer: A global perspective**. Washington: American Institute for Cancer Research; p.35-71, 508-40. 1997.

WU X.; CHEN V. W.; RUIZ B. ANDREWS P.; SU L. J.; CORREA P. Incidence of esophageal and gastric carcinomas among American Asians/Pacific Islanders, whites, and blacks: subsite and histology differences. **Cancer**; 106(3): 683-92. 2006.

ZAITSEV, V. Salting and marinading, In Fish Curing Processing, Moscow, **Mir. Publishers**, 1969.

ZARRINGHALAMI, S., SAHARI, M.A.; HAMIDI-ESFEHANI, Z. Partial replacement of nitrite by annatto as a colour additive in sausage. **Meat Science**, v. 81, n. 1, p. 281- 284, 2009.

ZHENG H.; TAKAHASHI H.; MURAI Y.; CUI Z.; NOMOTO K.; MIWA S. et al. Pathobiological characteristics of intestinal and diffuse-type gastric carcinoma in Japan: an immunostaining study on the tissue microarray. **Journal of clinical pathology**; 60(3):273-7. 2007.

ZILBERSTEIN, B.; MUERINO, D. R.; YAGI, O. K. et al. Resultados da gastrectomia D2 para o câncer gástrico: dissecação da cadeia linfática ou ressecção linfonodal múltipla. **Arquivos Brasileiros de cirurgia digestiva**, v.25. São Paulo, Set, 2012.