



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/ UNB
CURSO DE FARMÁCIA**

ANNE PÂMELA BARBOSA MOREIRA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE *SASHIMIS*
COMERCIALIZADOS EM RESTAURANTES ESPECIALIZADOS NA CULINÁRIA
JAPONESA NA CIDADE DE BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL**

BRASÍLIA - DF

2017

ANNE PÂMELA BARBOSA MOREIRA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE SASHIMIS
COMERCIALIZADOS EM RESTAURANTES ESPECIALIZADOS NA CULINÁRIA
JAPONESA NA CIDADE DE BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada
como requisito parcial para obtenção do grau de
Farmacêutico, na Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Castilho Orsi

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

BRASÍLIA - DF

2017

ANNE PÂMELA BARBOSA MOREIRA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE SASHIMIS
COMERCIALIZADOS EM RESTAURANTES ESPECIALIZADOS NA CULINÁRIA
JAPONESA NA CIDADE DE BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL**

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^a. Dr^a. Daniela Castilho Orsi
(FCE/ Universidade de Brasília)

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(FCE/ Universidade de Brasília)

Prof. Msc. Daniel Oliveira Freire
(Faculdade LS)

BRASÍLIA - DF

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos concedidas diariamente, por me dar força e perseverança para seguir em busca das realizações dos meus objetivos, e um deles é esta graduação no curso de Farmácia em uma Universidade Federal.

À minha família pela compreensão, estímulo e carinho em todos os momentos.

Aos meus pais, Antonina e Nonato, por todo o incentivo, amor, amizade, dedicação e aconselhamentos.

Ao meu irmão Klinsman, por toda ajuda de forma indireta e implicâncias.

Aos docentes da Universidade de Brasília, por toda paciência e conhecimento partilhado nas disciplinas ministradas.

À professora Dr^a Daniela Orsi, pela oportunidade, orientação e ensinamentos transmitidos durante este trabalho.

À minha co-orientadora professora Dr^a Izabel Cristina, pela ajuda e disposição para esclarecer todas as dúvidas.

À Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia, que me proporcionou momentos memoráveis, onde pude crescer adquirindo conhecimentos e fazer novas amizades.

Aos meus amigos pela companhia e apoio durante todo o curso.

A todos que contribuíram de alguma forma ao longo deste curso e aqui não foram mencionados, muito obrigado!

RESUMO

Nos últimos anos ocorreram mudanças no perfil alimentar da população brasileira que associada à oferta de pescado de qualidade no mercado interno aumentou o seu consumo. Há um destaque especial para as novas formas de apresentação do pescado, como por exemplo, *sushis* e *sashimis*. Desta forma, este trabalho teve como objetivo realizar as análises microbiológicas de amostras de *sashimis* à base de anchova, atum e tilápia comercializados em diferentes restaurantes especializados em culinária japonesa na cidade de Brasília- DF. Os resultados mostraram que as amostras de *sashimis* 6 e 7 apresentaram contagens elevadas de bactérias psicotróficas de $5,76 \times 10^7$ e $4,46 \times 10^9$ UFC/g, respectivamente, demonstrando que a qualidade desses produtos podiam estar comprometidas. As amostras 2 e 3 tiveram elevada enumeração de coliformes totais ($1,10 \times 10^3$ NMP/g). Todas as amostras apresentaram resultados positivos para a enumeração de coliformes termotolerantes, mas somente a amostra 7 ($1,18 \times 10^2$ NMP/g) teve enumeração de coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação brasileira ($1,0 \times 10^2$ NMP/g), estando imprópria para o consumo. Foi possível observar nesse estudo que cinco das sete amostras analisadas apresentaram cepas de *S. aureus*, mas as amostras de *sashimis* 5 e 7 apresentaram contagem de *S. aureus* acima dos valores permitidos na legislação brasileira e portanto estavam impróprias para o consumo. Por meio da análise molecular foram confirmadas as colônias suspeitas de *S. aureus* e *E. coli* em algumas das amostras analisadas. Conclui-se com os resultados desta pesquisa que as amostras de *sashimis* 5 e 7 estavam impróprias para o consumo.

Palavras chave: *sashimis*, qualidade microbiológica, análise molecular.

ABSTRACT

In recent years there have been changes in the food profile of the Brazilian population, which associated with the supply of quality fish in the domestic market increased its consumption. There is a special highlight for new ways of presenting the fish, such as *sushis* and *sashimis*. The objective of this work was to carry out the microbiological analysis of *sashimis* samples made from anchovy, tuna and tilapia and marketed in different restaurants specializing in Japanese cuisine in the city of Brasília - DF. The results showed that *sashimi* samples 6 and 7 presented elevated counts of psychotropic bacteria of 5.76×10^7 and 4.46×10^9 CFU/g, respectively; thus, demonstrating that the quality of these products could be compromised. Samples 2 and 3 presented high counts of total coliforms (1.10×10^3 MPN/g). All samples presented positive results for the enumeration of thermotolerant coliforms, but only sample 7 (1.17×10^2 MPN/g) presented thermotolerant coliform counts above the limit allowed by Brazilian legislation (1.0×10^2 MPN/g), being unfit for the consumption. It was possible to observe in this study that five of the seven samples analyzed showed strains of *S. aureus*, but the samples of *sashimis* 5 and 7 showed a *S. aureus* count above the values allowed by Brazilian legislation and therefore were unfit for consumption. By means of the molecular analysis the suspicious colonies of *S. aureus* and *E. coli* were confirmed in some of the analyzed samples. It is concluded from the results of this research that the samples of *sashimis* 5 and 7 were unfit for consumption.

Key words: *sashimi*, microbiological quality, molecular analysis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Culinária japonesa e consumo de peixe cru.....	9
1.2 Consumo de pescado no Brasil e no Distrito Federal	10
1.3 <i>Sashimis</i> de atum, anchova e tilápia.....	11
1.4 Fatores determinantes para a qualidade do pescado	13
1.5 O pescado como veículo transmissor de doenças ao homem.....	14
1.6 Avaliação microbiológica do <i>sashimi</i>	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. JUSTIFICATIVA.....	19
4. METODOLOGIA.....	20
4.1 Coleta e preparo das amostras	20
4.2 Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas	20
4.3 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes.....	21
4.4 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	23
4.5 Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	24
4.6 Análises moleculares e extração de DNA bacteriano	24
4.7 Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR.....	26
4.8 PCR qualitativo	27
4.9 Eletroforese em gel de agarose	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de <i>sashimis</i>	29
5.2 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de <i>sashimis</i>	30
5.3 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. nas amostras de <i>sashimis</i>	32
5.4 Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> nas amostras de <i>sashimis</i>	34
5.5 Análises moleculares	37
6. CONCLUSÃO	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número mais provável por grama (NMP/g) para 3 tubos com os inóculos de 0.1, 0.01, 0.001 mL e os respectivos intervalos de confiança a 95%	22
Tabela 2. Distribuição dos limites mínimos e máximos para a construção dos oligonucleotídeos	26
Tabela 3. Características dos oligonucleotídeos utilizados no estudo	27
Tabela 4. Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotóricas nas amostras de <i>sashimis</i>	29
Tabela 5. Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termolantes nas amostras de <i>sashimis</i>	31
Tabela 6. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. nas amostras de <i>sashimis</i>	33
Tabela 7. Contagem de bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> nas amostras de <i>sashimis</i>	35
Tabela 8. Identificação por meio de PCR de bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas das amostras de <i>sashimis</i>	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotos dos <i>sashimis</i> de anchova, tilápia e atum	12
Figura 2. Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI	24
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene EutC de <i>E. coli</i>	37
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene entC de <i>S. aureus</i>	38

1. INTRODUÇÃO

1.1 Culinária japonesa e consumo de peixe cru

Diversos acontecimentos contribuíram para a chegada da cultura japonesa no Brasil. Um dos primeiros fatos aconteceu em 1908, com a chegada dos primeiros imigrantes japoneses ao porto de Santos, em São Paulo. Segundo o IBGE (2014), o número de japoneses residentes no Brasil cresceu cerca de 82,3% entre 1920 e 1970. A globalização gerou a propagação do consumo de peixe cru através da culinária japonesa (EDWARDS, 2013).

A gastronomia japonesa é a que melhor representa a nação nipônica no território brasileiro. No total, os japoneses trouxeram mais de 50 tipos de alimentos ao Brasil. Essa influência se reflete ainda mais nos dias de hoje, por meio principalmente dos restaurantes de comida japonesa. Segundo a Associação Brasileira de Culinária Japonesa – ABCJ (2014) o número de restaurantes japoneses tem sido crescente nos últimos 10 anos.

A culinária japonesa é constituída por alimentos frescos e naturais principalmente peixes e vegetais (EDWARDS, 2013). Popularmente, os pratos da culinária japonesa são os *sushis*, compostos de arroz cozido temperado e enrolados com recheio e os *sashimis*, que são constituídos de pedaços de peixes in natura cortados em filés finos (CARROLL, 2009).

No Brasil, o consumo do pescado “in natura” cresce a cada ano, sendo o peixe cru um produto cada vez mais consumido em estabelecimentos especializados. Nesse contexto, a culinária japonesa pode ser destacada como uma das principais responsáveis pelo maior consumo de pescado, inovando a forma de apresentação desse alimento, em regiões onde habitualmente não existia (SANTOS, 2006).

Segundo o RIISPOA (BRASIL, 1997), a denominação "PESCADO" compreende os peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, quelônios e mamíferos de água doce ou salgada, usados na alimentação humana. O documento também classifica o grupo em relação à sua natureza como: fresco; resfriado; congelado. Por pescado fresco entende-se: o pescado sem ter sofrido qualquer processo de conservação, a não ser a ação do gelo. Entende-se por resfriado o pescado

devidamente acondicionado em gelo e mantido em temperatura entre -0,5 a -2°C. Por pescado congelado, entende-se aquele tratado por processos adequados de congelamento, em temperatura não superior a -25°C.

Segundo Fritsch (2004), o Brasil, atualmente, é o 25º maior produtor de pescado e sua produção vem crescendo, apresentando um grande potencial para se tornar o maior produtor de pescado cultivado no mundo. No caso da produção, dados do IBGE apontam que, em 2015, foram 483 mil toneladas de peixe, com incremento de 1,5% em relação a 2014.

1.2 Consumo de pescado no Brasil e no Distrito Federal

Nos últimos anos, tem-se observado uma mudança no perfil alimentar da população brasileira, que associada à oferta de pescado de qualidade no mercado interno, aumentou o seu consumo, com destaque para a oferta de novas formas de apresentação desses alimentos (GERMANO & GERMANO, 2008). Houve uma rápida difusão do consumo de *sushi* e *sashimi*, alimentos anteriormente pouco disponíveis. Locais especializados nesse tipo de culinária são cada vez mais frequentados, levando à preocupação crescente dos órgãos ligados à Saúde Pública, principalmente pelo fato desses alimentos serem altamente perecíveis, consumidos sem processamento térmico ou fermentativo, demandando condições higiênico-sanitárias adequadas para sua preparação e conservação (VIEIRA et al., 2007).

Segundo o boletim Estatístico de Pesca e Aquicultura de 2011, elaborado pelo Ministério de Pesca e Aquicultura (MPA, 2011), a média do consumo de pescados por habitantes/ano no Brasil alcançou 11,17 quilos em 2011, o que representa um aumento de 14,5% com relação ao ano anterior. Em dois anos (2010 e 2011) o crescimento da demanda de peixes e frutos do mar aumentou cerca de 23,7% em média.

O Distrito Federal é um importante mercado consumidor de pescados. A demanda atinge 11.231 t/ano e o consumo per capita é 12,80kg. Resende et al. (2009) relatou que o consumo de pratos típicos da culinária japonesa cresceu 20%, em Brasília, entre 2001 e 2002. O pescado possui alta perecibilidade e o Distrito Federal dista geograficamente dos principais centros produtores. Devido a isso é

fundamental avaliar continuamente a qualidade desses produtos sob os aspectos de desperdício e de saúde pública (ALVES et al., 2002).

Realmente, a busca por um padrão alimentar saudável favorece o consumo de pratos japoneses, pois os mesmos são coloridos, com grande variedade de vegetais e pouca ou nenhuma cocção, o que ajuda na preservação do valor nutritivo dos alimentos (TORRES et al., 2005). A comida japonesa passou a ter uma conotação desde exótica, representando um estilo de alimentação, até a de fast food consciente de saúde, uma vez que são pratos cujo tempo de preparo é relativamente curto, atendendo às necessidades do mundo moderno e ao mesmo tempo configurando uma alternativa aos fast foods convencionais, ricos em calorias, gorduras e colesterol (CWIERTKA, 2005).

1.3 Sashimis de atum, anchova e tilápia

A palavra *sashimi* significa simplesmente “carne cortada” (HOLZMANN, 2006). O *sashimi* é uma iguaria da culinária do Japão primariamente consistindo de peixes e frutos do mar frescos, cortados em fatias finas. O pescado destinado à elaboração do *sashimi* deve ser fresco e não pode ser submetido ao congelamento, podendo apenas ser resfriado visando ao retardo do desenvolvimento microbiano (HAMADA-SATO et al. 2005; YANO et al. 2004).

No Brasil os peixes mais utilizados para a elaboração de *sashimi* são: salmão, atum e anchova (pescado de água salgada), além da tilápia (pescado de água doce). O atum (*Thunnus* spp) é um peixe pelágico (do latim *pelagos* significa "mar aberto", são os peixes que vivem em águas oceânicas abertas), da família *Scombridae*, tendo grande velocidade migratória, tanto para ir à busca de alimentos como para a desova. São peixes oportunistas, alimentando-se de peixes, cefalópodes e crustáceos. Devido a sua capacidade de formar cardumes, os atuns têm grande importância industrial, pois podem ser capturados em grandes quantidades e em menor tempo. Os atuns são considerados "nômades do mar" pelas grandes migrações anuais e pela ampla distribuição por quase todos os mares e oceanos; em águas tropicais, subtropicais, temperadas e frias, podendo habitar regiões costeiras e oceânicas do mundo, razão pela qual os cardumes podem ser

explorados em vários países distribuídos pelos oceanos Pacífico, Índico e Atlântico (FAO, 2000, RAMIREZ, 2015).

A anchova (*Pomatomus saltatrix*), da família *Pomatomidae*, também é um peixe oceânico pelágico migratório. Trata-se de uma espécie cosmopolita, que vive ao redor de quase todo o planeta, habitando principalmente águas tropicais e subtropicais, exceto o leste do Pacífico. Os adultos são observados em cardumes, sendo considerados grandes predadores, com característica voraz e agressiva. Alimentam-se de peixes, crustáceos e cefalópodes, podendo associar-se a tubarões e grande peixes migradores. Além de ser alvo dos segmentos de pesca industrial e artesanal, também é muito apreciado pela pesca amadora, por tratar-se de um peixe agressivo e guerreiro (CEPSUL 2009; FAO, 2017).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é pertencente à família *Cichlidae*, sub-família *Pseudocrenilabrinae*. A tilápia do Nilo, originária dos rios e lagos africanos, representa uma das espécies de água doce mais cultivadas em todo o mundo (FAO, 2007; SOARES & GONÇALVES, 2012). No Brasil, a expansão da tilápia tem sido impulsionada pela demanda do mercado consumidor e por sua boa aceitação quanto ao sabor, valor nutritivo e preço baixo. A tilápia apresenta requisitos típicos dos peixes preferidos do consumidor, tais como carne branca de textura firme, sabor delicado, não tendo espinhos e nem odor desagradável. É um peixe de fácil filetagem, com alto rendimento de filé (35 a 40%) em exemplares com peso médio de 450 a 500 g, o que a torna apropriado para industrialização (SIMÕES et al., 2007; SOARES & GONÇALVES, 2012).

Além de conter quantidade significativa de proteínas, minerais e vitaminas, os peixes são excelentes fontes de ácidos graxos essenciais polinsaturados como ômega-3 (ORDOÑEZ, 2005). A figura 1 apresenta as fotos dos *sashimis* de anchova, tilápia e atum.



Figura 1. Fotos dos *sashimis* de anchova, tilápia e atum.

1.4 Fatores determinantes para a qualidade do pescado

Segundo JAY (2005), a microbiota do pescado reflete a água onde esses animais vivem, visto que os tecidos internos de um peixe sadio são estéreis. A microbiota dos peixes normalmente é encontrada em três lugares: na superfície externa, nas guelras e nos intestinos. Os peixes de água morna tendem a ter a microbiota mais rica em bactérias mesófilas Gram-positivas do que peixes de água fria, os quais têm mais bactérias Gram-negativas. A microbiota de peixes vindos de água doce é também influenciada pela temperatura e será maior do que a de ambientes marinhos. Em documentos da FAO (1997) há relatos sobre a qualidade sanitária da água onde os animais habitam como sendo um dos principais fatores para a obtenção de um produto final com uma boa qualidade microbiológica.

Além do local da pesca, outros fatores são responsáveis pela microbiota do peixe, como, por exemplo, os métodos e condições de pesca, cuidados com o pescado a bordo, proximidade da costa, época do ano, manipulação, processamento e qualidade da água do gelo utilizado (BASTI et al. 2006; HAMADA-SATO et al. 2005; HUSS et al. 2000; REIJ e DEN AANTREKKER 2004; VIEIRA et al., 2004).

Para manter a microbiota natural do pescado cru em níveis convenientemente baixos e livres da contaminação por patógenos é necessário que todo o seu processamento seja efetuado sob condições sanitárias rigorosas. Durante a sua distribuição e comercialização é de extrema importância que o pescado seja mantido resfriado no gelo. A quantidade de gelo deve ser suficiente para manter a temperatura do pescado por volta de 0 a 2°C. (GIAMPIETRO & REZENDE-LAGO, 2009; SOARES & GERMANO, 2004).

A importância da qualidade microbiológica do gelo é enfatizada quando sua finalidade é de conservar alimentos, especialmente os peixes. GERMANO E GERMANO (2008) afirmam que o contato dos peixes com o gelo produzido com água de má qualidade é um dos meios mais frequentes de contaminação destes produtos. A importância do uso de gelo de qualidade é citada por PIMENTEL et al. (2004) e PANETTA (2003), salientando que a deterioração do pescado na ausência de gelo é acelerada. Estes autores verificaram que na ausência de gelo para a manutenção do pescado, o pH, histamina, trimetilamina, bases voláteis totais e principalmente a multiplicação microbiana aumentam significativamente. Na

presença de gelo a proliferação bacteriana é reduzida. Portanto, a qualidade e a quantidade de gelo são imprescindíveis para a manutenção do frescor do pescado (GERMANO e GERMANO, 2008; PANETTA, 2003; PIMENTEL et al., 2004; SOULTOS et al., 2006).

Segundo SILVA JUNIOR (2001), o binômio: tempo x temperatura forma, junto com o fator higiene, o sucesso da produção comercial de peixes, visto que deles dependem a segurança e qualidade do produto final. Conforme descrição da FAO (1997), o tempo está intimamente relacionado com a rapidez com que se desencadeiam as reações autolíticas e bacterianas no pescado. A higiene do barco e dos manipuladores, somado as baixas temperaturas, evita ou, pelo menos, retarda essas reações que levam a deterioração do pescado.

A qualidade do peixe fresco pode ser influenciada por hábitos não higiênicos dos manipuladores, podendo comprometer a qualidade higiênico-sanitária do alimento (PACHECO et al., 2004). Na produção do *sashimi*, a higiene do manipulador e de tudo o que entra em contato com o alimento deve ser muito rígida e é de extrema importância para a produção segura e inocuidade do produto final (TEDESCO et al, 2005). O consumo do pescado in natura sem condições higiênicas sanitárias adequadas representa um grande risco à saúde coletiva, por não haver as barreiras térmicas (cozimento) para eliminar as bactérias do alimento e assim garantir sua inocuidade (CORREIA, 2002).

1.5 O pescado como veículo transmissor de doenças ao homem

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

Os pescados são reconhecidos como ótimas fontes de proteínas e ácidos graxos essenciais, porém comer peixes crus pode representar risco à saúde, principalmente, para determinados grupos de riscos como os imunodeprimidos,

idosos, crianças e grávidas (SENAC, 2004). Segundo SILVA JR. (2001), preparações muito manipuladas são consideradas de alto risco, especialmente quando elaboradas por pessoas que não possuam treinamento adequado. Além disso, preparações à base de pescados crus já oferecem risco maior à saúde pelo fato de não serem submetidos a tratamentos bactericidas, como cocção (HAMADA-SATO et al. 2005; HUSS et al. 2000).

A ICMSF (2005) alerta para os problemas com o consumo de pescado, quanto ao fato deste alimento poder ser veiculador de micro-organismos patogênicos para o ser humano. Algumas bactérias patogênicas para os seres humanos são parte da microflora normal do ambiente marinho. Estas incluem várias espécies de *Vibrio*.

Peixes contaminados com bactérias do gênero *Salmonella*, tanto de origem humana (*S. typhi* e *S. paratyphi*), quanto às de origem animal, bem como o gênero *Shigella*, refletem o resultado de águas poluídas por esgotos ou excretas de animais. Dentre as conseqüências diretas da manipulação inadequada, são apontados contaminação do pescado por *Streptococcus* sp. e *Staphylococcus aureus*, ambos de origem humana, encontrados nas mucosas e superfície da pele e que encontram no pescado ambiente favorável para sua multiplicação. Outros agentes bacterianos podem contaminar o pescado e causar risco à saúde, como as cepas psicrótróficas de *Bacillus cereus* que podem produzir enterotoxinas nos alimentos elaborados à base de peixe, sobretudo os com pH superior a 6,0, acarretando surtos caracterizados por diarreia (ICMSF, 2005).

A difilobotríase é uma parasitose intestinal, conhecida como tênia dos peixes, que causa prejuízos à saúde humana. O parasita dos peixes é um verme cientificamente chamado de *Diphyllobothrium latum* e representa uma das espécies de helmintos (vermes) achatados (platelmintos) que adquirem o maior tamanho entre os helmintos. Os humanos tornam-se infectados quando ingerem peixe cru, ou mal cozido, contendo as larvas do verme na forma infectante (BALBANI & BUTUGAN, 2001; CAPUANO et al., 2007).

Prevenir a contaminação do pescado na pré-captura é muito difícil ou impossível. O ambiente natural não pode ser modificado facilmente e os agentes causadores de doenças que ocorrem naturalmente (algumas bactérias patogênicas, parasitas, biotoxinas) estarão sempre presentes. Já a contaminação química e

poluição fecal podem ser prevenidas, com o monitoramento das áreas de pesca, pela verificação de presença de algas tóxicas e de coliformes fecais e *Escherichia coli* (HUSS et al. 2000; REIJ; DEN AANTREKKER, 2004).

1.6 Avaliação microbiológica do sashimi

A avaliação microbiológica é considerada um dos melhores métodos de controle da qualidade do pescado (TAVARES e GONÇALVES, 2011). De acordo com FRANCO e LANDGRAF (2008), os micro-organismos indicadores, quando presentes em alimentos, fornecem informações sobre prováveis contaminações de origem fecal, presença de patógenos ou ainda sobre o potencial de deterioração do produto, além de indicarem se as condições sanitárias foram adequadas durante o processamento, produção ou armazenamento de um alimento.

A legislação brasileira, através da RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, estabelece os padrões microbiológicos para alimentos destinados ao consumo humano e define no item 22b do anexo I (Pratos Prontos para Consumo à base de carnes, pescados e similares crus como quibe cru, *carpaccio*, *sushi* e *sashimi*), as seguintes análises: coliformes termotolerantes; estafilococos coagulase positiva (*S. aureus*); *Salmonella* spp. e *Vibrio parahaemolyticus* (BRASIL, 2001).

A contaminação de origem fecal no pescado está relacionada à presença de *Escherichia coli*, principal representante dos coliformes termotolerantes. Essa bactéria é considerada a indicadora mais específica de contaminação fecal recente e de eventual presença de organismos patogênicos entéricos. De acordo com MARTINS (2006), os micro-organismos *Escherichia coli* e *Aeromonas* spp. podem ser encontrados em peixes frescos ou congelados, frutos do mar e produtos industrializados. Muitos destes micro-organismos estão relacionados com a qualidade da água, do gelo utilizado na conservação e/ou procedimento pós-captura (HUSS et al. 2000; SCHLUNDT, 2002; MATTÉ, 2003; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Germano e Germano (2008), descrevem bactérias mesófilas como micro-organismos cujo crescimento atinge uma temperatura ótima de 30°C a 45°C, sendo a mínima 5°C e a máxima, 47°C. Neste grupo de bactérias, estão inseridos os principais patógenos envolvidos em doenças de origem alimentar. Por este motivo, é importante, na maioria das pesquisas, mesmo quando específicas para um

patógeno, quantificar as bactérias mesófilas para se fazer uma avaliação geral dos alimentos (HUTTEN, 2000). As bactérias mesófilas são consideradas como índice de sanidade e indicam se a manipulação e as condições de conservação foram adequadas (JAY, 2005).

Dessa forma, é importante pesquisar a qualidade microbiológica em pratos preparados de *sashimis*, pois os mesmos podem transmitir micro-organismos patogênicos, os quais quando em alta quantidade e associados à produção de toxinas, podem desencadear doenças gastrointestinais. Através da avaliação microbiológica é possível obter informações importantes sobre a qualidade da matéria-prima utilizada, higiene e sanificação da manipulação, adequação das técnicas utilizadas na preservação do produto ao longo do processamento e eficiência das operações de transporte e armazenamento do produto final. Nestas condições, em função da avaliação microbiológica do produto, será possível ter uma estimativa da sua vida útil ou de sua vida de prateleira, bem como, pela pesquisa de micro-organismos patogênicos ou indicadores de contaminação fecal, será confirmada ou não a existência de risco à saúde pública advindo de seu consumo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Este trabalho teve como objetivo realizar as análises microbiológicas de *sashimis* à base de atum, anchova e tilápia comercializados em restaurantes especializados em culinária japonesa na cidade de Brasília- DF.

2.2 Objetivos específicos:

- Realizar as análises bacteriológicas: contagem total dos micro-organismos mesófilos e psicotróficos, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus*, pesquisa de *Escherichia coli* e pesquisa de *Salmonella* spp.
- Realizar genotipagem através da técnica de PCR para confirmação dos micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

3. JUSTIFICATIVA

Atualmente a culinária japonesa tem agradado cada dia mais o paladar do brasileiro, sendo caracterizada pelos alimentos preparados à base de peixe cru, tendo como destaque os diferentes tipos de *sushis* e *sashimis*. Alimentos elaborados com peixe cru necessitam de um cuidado especial, pois dentre os produtos de origem animal, o peixe é um dos mais susceptíveis ao processo de deterioração, podendo ter um elevado crescimento de bactérias que causam alterações e levam a deterioração. O *sashimi* está sujeito à contaminação por vários micro-organismos patogênicos, sendo um alimento com potencial risco de transmissão de doenças para o homem, devido ao fato de ser bastante manipulado na sua preparação, de ser consumido cru e de exigir armazenamento com temperatura de refrigeração correta. As análises microbiológicas das amostras de *sashimis* coletadas na cidade de Brasília poderão determinar se os restaurantes especializados em culinária japonesa atendem os padrões de qualidade e se esses alimentos prontos para consumo estão sendo comercializados com segurança alimentar para o consumidor.

4. METODOLOGIA

4.1 Coleta e preparo das amostras

As sete amostras de *sashimis* de atum, anchova e tilápia foram coletadas em sete diferentes restaurantes especializados em culinária japonesa na cidade de Brasília – DF. As coletas foram realizadas por um período de três meses (outubro a dezembro de 2016).

As amostras refrigeradas (acondicionadas em embalagens fechadas e térmicas) foram levadas imediatamente após a coleta nos restaurantes para o laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ceilândia- UnB e na sequência iniciou-se o processo de preparo das amostras e análises microbiológicas.

Para o preparo das amostras, pesou-se 25g da amostra em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v) estéril e após homogeneização, obteve-se a primeira diluição (10^{-1}). A partir desta foram realizadas as demais diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% (p/v) até a diluição 10^{-5} .

As análises microbiológicas realizadas foram: contagem total dos micro-organismos mesófilos e psicrotróficos, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus* e pesquisa de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como média e desvio padrão.

4.2 Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas

Para contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas, inoculou-se 0,1 mL de cada diluição na superfície das placas contendo o meio de cultivo Agar Padrão para Contagem. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para bactérias mesófilas e a 7°C ± 1°C por 7 dias para bactérias psicrotróficas. Para a contagem de colônias, selecionaram-se as placas contendo entre 25 a 250 colônias, multiplicando-se o valor encontrado pelo fator de diluição correspondente e

expressando o resultado em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama de amostra (UFC/g).

4.3 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes

Para a determinação do NMP de coliformes, inoculou-se 1 mL de cada diluição em uma série tubos de ensaio contendo caldo lactosado (lactose 0,5% (p/v), peptona bacteriológica 0,5% (p/v) e extrato de carne 0,3% (p/v) e tubos de Durham invertidos e a incubou-se a 37°C durante 24 horas. Após a incubação foi verificado os tubos positivos (com turvação e produção de gás nos tubos de Durham) e estes foram considerados prova presuntiva positiva para coliformes totais.

Alíquotas dos tubos positivos no caldo lactosado foram transferidas, simultaneamente, para caldo verde brilhante bile lactose 2% (para a confirmação de coliformes totais) e para caldo *Escherichia coli* (para a confirmação de coliformes termotolerantes). Os tubos contendo caldo verde brilhante bile lactose 2% e tubos de Durham invertidos foram incubados a 37°C por 24 horas. A presença de gás indicou prova confirmatória positiva para coliformes totais. Os tubos contendo caldo *Escherichia coli* e tubos de Durham invertidos foram incubados em banho-maria a 45°C por 24 horas. A presença de gás indicou prova confirmatória positiva para coliformes termotolerantes.

A técnica de Número Mais Provável (NMP) é um método que estima a densidade de micro-organismos viáveis presentes em uma amostra. A determinação do NMP de micro-organismos é baseada no princípio de que, numa amostra líquida as bactérias podem ser separadas por agitação, resultando numa suspensão em que as células estejam uniformemente distribuídas. A comparação de tubos com crescimento positivo ou negativo, após a incubação, permite estimar, por cálculo de probabilidade, a densidade original dos micro-organismos na amostra (FENG et al., 2002). Através da Tabela 1 foi obtido o NMP de coliformes totais e de coliformes termotolerantes por grama da amostra (NMP/g).

Tabela 1. Número mais provável por grama (NMP/g) para 3 tubos com os inóculos de 0.1, 0.01 e 0.001 mL e os respectivos intervalos de confiança a 95%.

Tabela para 3 tubos, cada um com inóculo de 0.1, 0.01 e 0.001 mL, os NMPs por grama e os intervalos de confiança a 95%.											
Tubos positivos			NMP/g	Limite de confiança		Tubos positivos			NMP/g	Limite de confiança	
0.10	0.01	0.001		Baixo	Alto	0.10	0.01	0.001		Baixo	Alto
0	0	0	<3.0	–	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	–

FONTE: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods>

4.4 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., a diluição 10^{-1} das amostras foi incubada à 37°C por 24 horas, esta fase é caracterizada como pré-enriquecimento geral. Após a incubação, alíquotas de 1 mL foram transferidas para caldo selenito-cistina e incubadas a 37°C por 24 horas, esta fase é caracterizada como enriquecimento seletivo. Após a incubação, procedeu-se à técnica de isolamento, onde a partir de cada tubo, semeou-se em estrias para isolamento, placas de Petri contendo o meio Agar *Salmonella Shigella* (Agar SS). As colônias não fermentadoras de lactose e/ou com pigmento negro foram isoladas novamente em Agar *Salmonella Shigella* para obtenção de colônias puras e então estas foram transferidas para meio de cultivo contendo Agar TSI (três açúcares e ferro).

O cultivo Agar TSI meio contém três açúcares: glicose (0,1%), lactose (1%) e sacarose (1%), além do indicador vermelho de fenol para detecção da fermentação de carboidratos. As enterobactérias como *E. coli*, *Enterobacter* e *Klebsiella* fermentam a glicose e a lactose e/ou sacarose (2 ou 3 açúcares do meio) tornando a base e a superfície do tubo da cor vermelha para a cor amarela e geralmente é possível detectar a presença de gás (CO_2) pela formação de bolhas e/ou fragmentação do meio. Quando a superfície do meio está vermelha e a base amarela significa que ocorreu fermentação apenas da glicose (ficando a lactose e a sacarose sem fermentação). Se o micro-organismo em estudo for capaz de produzir sulfeto de hidrogênio (H_2S), este se conjuga com um composto de ferro existente no meio, dando origem a sulfeto de ferro que, sendo insolúvel, precipita e tem cor negra (indicado pela cor preta na base do tubo) (ANVISA, 2010). Essa reação é característica de enterobactérias não fermentadoras de lactose como *Shigella* e também produtoras de H_2S como *Salmonella* (ANVISA, 2010). A figura 2 apresenta as reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI.

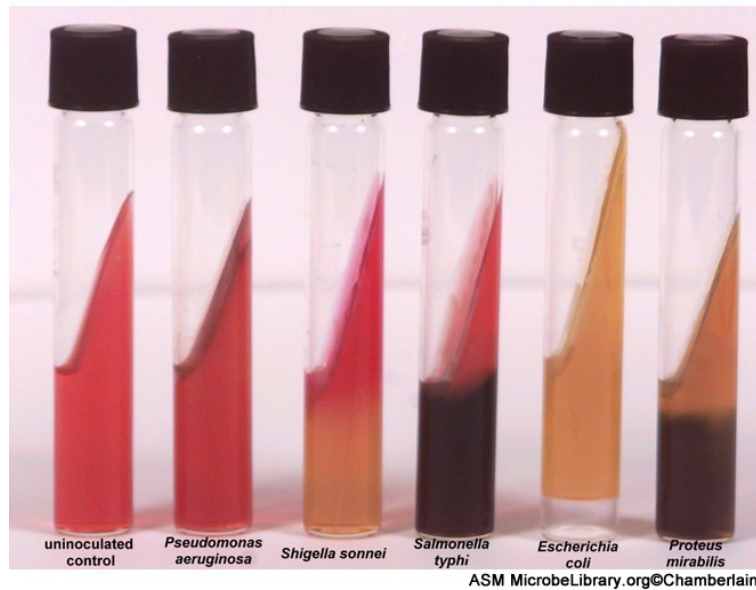


Figura 2. Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI (Fonte: ASM microbelibrary.org).

4.5 Contagem de *Staphylococcus aureus*

Para a contagem de *Staphylococcus aureus*, as amostras foram semeadas em meio de cultivo Agar PCA suplementado com cloreto de sódio 7,5% (p/v) e incubadas a 37°C por 48 h. Após incubação, as colônias isoladas foram semeadas em Agar Sal Manitol e incubadas em 37°C por 48h. As colônias fermentadoras de manitol foram contadas e posteriormente coradas pelo método de Gram. As colônias suspeitas de serem *S. aureus* foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR.

4.6 Análises moleculares e extração de DNA bacteriano

Antes de iniciar a extração de DNA bacteriano foi feito o preparo das soluções reagentes (o tampão AW foi colocado em banho-maria à 50°C), materiais e amostras. As amostras foram representadas pelas colônias de bactérias isoladas das amostras de *sashimis* suspeitas de serem patogênicas e cultivadas por 12 h em caldo LB.

A extração de DNA bacteriano foi realizada utilizando o kit Nucleo Spin Food Kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), com adaptações, descritas a seguir:

Adicionou-se 9,0 mL da amostra (suspensão de células bacterianas em caldo LB) no tubo cônico tipo falcon de 15 mL, centrifugou-se por 7 minutos a 5000 rpm e descartou-se o sobrenadante (com cuidado para não descartar o sedimento). Foram adicionados 25 µL de proteinase K e 200 µL do tampão CF (tampão de lise celular pré-aquecido a 65°C), encostando a ponteira no Pellet e misturando (este tampão tem como função impedir a formação de grumos celulares). Após isso, os tubos foram homogeneizados em “vortex”, até a completa homogeneização da solução. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C, por 30 minutos.

Em seguida, foram adicionados 300 µL do tampão C4 (contém isotiocianato de guanidina), 300 µL de etanol 96%, homogeneizou-se e deixou descansar por 5 minutos (esta etapa é importante para a lise das paredes e das membranas celulares, com liberação do conteúdo da célula).

Na etapa seguinte, enumeraram-se os tubos contendo filtros com sílica (fornecidos pelo kit), transferiu-se o sobrenadante para o filtro e após filtração centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm. Descartou-se o que foi filtrado, adicionou-se 400 µL do tampão CQW e centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm. Novamente, foi descartado o filtrado. Adicionou-se 700 µL do tampão C5, centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm e descartou-se o filtrado (os tampões CQW e C5 contêm isotiocianato de guanidina, em concentrações decrescentes, para facilitar a adsorção do DNA na sílica e a retirada das outras biomoléculas da amostra. Também contêm etanol, para facilitar a precipitação). Por fim, foi feita outra centrifugação com o tubo vazio, por 1 minuto a 15.000 rpm.

Após isto, o filtro contendo DNA foi trocado para um eppendorf de 1,5 mL, onde foi adicionado 100 µL do tampão Elution Buffer CE pré-aquecido a 70°C (este tampão favorece a eluição do DNA). Após uma pré-incubação de 5 minutos a temperatura ambiente, centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm e descartou-se o filtro. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C. A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram determinadas por eletroforese em gel de agarose, em comparação com o padrão de massa molecular DNAI/HindIII marcador de 100 pb (JENA®).

4.7 Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR

A seleção das regiões gênicas a serem analisadas para *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella* spp. foi realizada conforme busca na literatura e optou-se por três regiões gênicas específicas, para os quais os oligonucleotídeos foram redesenhados no presente estudo:

- EutC: anotação descrita para o gene codante da Etanolamina amônia liase em *E. coli*
- entC: anotação descrita para o gene que codifica enterotoxina C do *S. aureus*
- invA: anotação descrita para o gene que codifica proteínas de invasão celular da *Salmonella* entérica.

A partir da descrição das sequências referentes às regiões específicas para uma dada região genômica recuperadas no programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), foram desenhados oligonucleotídeos usando o programa Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Os parâmetros utilizados para a construção dos primers estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição dos limites mínimos e máximos para a construção dos oligonucleotídeos

Parâmetro	Limite mínimo	Limite máximo
Temperatura de anelamento	58°C	62°C
Conteúdo de GC no oligonucleotídeo	20%	80%
Tamanho do Oligonucleotídeo	18 bases	27 bases
T _m do amplicon	75°C	85°C
Tamanho do amplicon	80 bases	600 bases

Após selecionar os pares de oligonucleotídeos que atendiam a essas condições, foi utilizado o programa OligoAnalyzer da Integrated DNA Technologies (IDT) (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) para verificar a formação de dímeros, dobramento (hairpin) e [Símbolo]G de formação de híbridos. Os primers específicos obtidos para este estudo estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Características dos oligonucleotídeos utilizados no estudo

Oligonucleotídeo	Sequência (5´ 3´)	Produto estimado	Espécie
entC_F	TTTTACACCCAACGTATTAGCAGA	401 pb	<i>S. aureus</i>
entC_R	TCCCATTATCAAAGTGGTTTCC		
EutC_F	TCTATGGGCTGTGACTGCTG	113 pb	<i>E. coli</i>
EutC_R	GGCATCCCCATGATGTAGTT		
invA_F	GCTGATGCCGGTGAAATTAT	445 pb	<i>Salmonella entérica</i>
invA_R	CGACAAGACCATCACCAATG		

4.8 PCR qualitativo

Após a extração do DNA, a amplificação de fragmentos de genes foi realizada utilizando o termociclador Techne[®] modelo TC-512. As condições de termociclagem foram 95°C por 2 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, seguida de 60°C por 1 minuto, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 1 minuto para a extensão dos fragmentos.

Foram utilizados, para cada reação de PCR: 2,5 µL de tampão 10x (10mM de Tris e 50mM de KCl), 0,7 µL de MgCl₂, 1,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µL de Taq-Polimerase (Cenbiot, 5U/µL), 1,5 µL de oligonucleotídeos forward e reverse (10 µM), completando com água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação com a amplificação de 10 ng de DNA extraído da amostra bacteriana.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultra-violeta. Os marcadores de massa molecular utilizados foram o de 100pb ou de 50pb DNAI/HindIII (JENA[®]).

4.9 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de extração do DNA e PCR foram analisados em gel de agarose 2%. O tempo de corrida do gel é de aproximadamente 1 hora e 30 minutos, sendo que no início foi usado a voltagem de 50 V e após começar a correr o gel,

aumentou-se a voltagem para 100 V. Utilizou-se o marcador de 100 pB (pares de bases). Foi adicionado 3 μ L de corante Bromophenol (que tem a função de fazer uma ligação na amostra de DNA e permitir a visualização da corrida no gel de agarose) em 7 μ L de amostra. Para o preparo do gel foi utilizado TBE (Tris- Ácido Bórico), agarose e brometo de etídio (que tem função de corar o gel e permitir a visualização do DNA, quando colocado à luz ultravioleta).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de *sashimis*

A análise microbiológica para se verificar a quantidade de micro-organismos presentes nos alimentos é fundamental para se conhecer as condições de higiene em que o alimento foi preparado, os riscos que o alimento pode oferecer à saúde do consumidor e se o alimento terá ou não a vida útil pretendida. O método contagem de micro-organismos em placas é um método geral, que pode ser utilizado para contagem de grandes grupos microbianos, como mesófilos, psicrotróficos, termófilos, bolores e leveduras, variando-se o tipo de meio, a temperatura e o tempo de incubação (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Segundo a ICMSF (Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos, 2002), o número de micro-organismos mesófilos encontrado em um alimento tem sido um dos indicadores microbiológicos da qualidade mais comumente utilizados. Apesar de a legislação brasileira (BRASIL, 2001) não estabelecer limites para a contagem total de micro-organismos nos alimentos, a especificação para essa contagem dada pela ICMSF (ICMSF, 2002), permite uma contagem máxima de $1,0 \times 10^7$ UFC/g.

A tabela 4 apresenta as contagens totais de bactérias mesófilas e psicrotróficas das sete amostras de *sashimis* analisadas neste estudo. Os resultados foram expressos como média de unidades formadoras de colônias por grama de *sashimi* (UFC/g) e log de UFC/g com o desvio padrão.

Tabela 4. Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de *sashimis*

Amostras de <i>sashimis</i>	Bactérias mesófilas		Bactérias psicrotróficas	
	UFC/g	Log UFC/g \pm DP	UFC/g	Log UFC/g \pm DP
Amostra 1	$2,93 \times 10^5$	$5,44 \pm 0,17$	$3,47 \times 10^6$	$6,48 \pm 0,28$
Amostra 2	$9,60 \times 10^3$	$3,93 \pm 0,27$	$5,53 \times 10^5$	$5,74 \pm 0,05$
Amostra 3	$4,71 \times 10^4$	$4,58 \pm 0,35$	$6,46 \times 10^4$	$4,78 \pm 0,19$
Amostra 4	$1,73 \times 10^4$	$3,91 \pm 0,67$	$1,13 \times 10^5$	$5,04 \pm 0,12$
Amostra 5	$1,46 \times 10^4$	$4,07 \pm 0,34$	$1,96 \times 10^5$	$5,28 \pm 0,08$
Amostra 6	$6,50 \times 10^3$	$3,80 \pm 0,10$	$5,76 \times 10^7$	$4,74 \pm 0,13$
Amostra 7	$6,33 \times 10^5$	$5,69 \pm 0,42$	$4,46 \times 10^9$	$6,64 \pm 0,02$

Os resultados foram expressos como média de análises em triplicata; DP = desvio padrão

Neste estudo, as amostras de *sashimis* mostraram contagens de bactérias mesófilas entre $6,50 \times 10^3$ e $6,33 \times 10^5$ UFC/g e contagens de bactérias psicotróficas entre $6,46 \times 10^4$ e $4,46 \times 10^9$ UFC/g. As amostras de *sashimis* 6 e 7 apresentaram contagens de bactérias psicotróficas de $5,76 \times 10^7$ e $4,46 \times 10^9$ UFC/g, respectivamente, podendo ser consideradas produtos com a qualidade comprometida.

A elevada contagem de micro-organismos psicotróficos indica possível deterioração dos alimentos refrigerados (JAY, 2005; FORSYTHE, 2002; FRANCO e LANDGRAF, 2008). As bactérias que crescem nos alimentos refrigerados são chamadas de psicotróficas e tem a capacidade de multiplicar-se em temperaturas baixas. A presença de um grande número de espécies de micro-organismos psicotróficos pode estar relacionada com deterioração e perda da qualidade organoléptica dos alimentos (GRAM & DALGAARD, 2002).

5.2 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de *sashimis*

A técnica do Número mais provável (NMP), também chamada técnica dos tubos múltiplos é bastante utilizada pelos laboratórios de microbiologia de alimentos para estimar a contagem de alguns grupos de micro-organismos, como coliformes totais e coliformes termotolerantes (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

O grupo de coliformes totais é composto por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, predominando os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. Como a maioria destes é encontrada no ambiente, onde permanecem por tempo superior ao das bactérias patogênicas de origem intestinal, a presença de coliformes totais num alimento não indica necessariamente a contaminação fecal recente. Portanto, a contagem de coliformes fecais fornece informações sobre as condições higiênicas do produto (JAY, 2005; FORSYTHE, 2002; MARTINS, 2006).

Os coliformes termotolerantes, também denominados coliformes fecais, são um subgrupo dos coliformes totais, definidos como aqueles capazes de fermentar a lactose com produção de gás, no período de 24-48 horas a 45°C (FORSYTHE, 2002; MARTINS, 2006; SILVA JR, 2001). *E. coli* é a principal espécie de bactéria representante do grupo dos coliformes fecais. É considerada a indicadora mais

específica de contaminação fecal recente e de eventual presença de micro-organismos patogênicos entéricos (BRASIL, 2004).

A tabela 5 apresenta os resultados deste estudo para a determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de *sashimis*.

Tabela 5. Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de *sashimis*.

Amostras de <i>sashimis</i>	Coliformes totais		Coliformes termotolerantes	
	NMP/g	Log NMP/g \pm DP	NMP/g	Log NMP/g \pm DP
Amostra 1	$2,50 \times 10^1$	$1,38 \pm 0,19$	$0,69 \times 10^1$	$0,79 \pm 0,24$
Amostra 2	$1,10 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,00$	$1,06 \times 10^1$	$1,00 \pm 0,20$
Amostra 3	$1,10 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,00$	$3,46 \times 10^1$	$1,39 \pm 0,41$
Amostra 4	$2,10 \times 10^2$	$2,31 \pm 0,12$	$1,66 \times 10^1$	$1,21 \pm 0,09$
Amostra 5	$1,47 \times 10^1$	$1,10 \pm 0,29$	$0,70 \times 10^1$	$0,71 \pm 0,40$
Amostra 6	$0,30 \times 10^1$	$0,48 \pm 0,00$	$0,30 \times 10^1$	$0,48 \pm 0,00$
Amostra 7	$1,18 \times 10^2$	$1,82 \pm 0,55$	$1,18 \times 10^2$	$1,82 \pm 0,55$

Os resultados foram expressos como média de análises em triplicata; DP = desvio padrão

A legislação brasileira (BRASIL, 2001) não estabelece limites de tolerância para o grupo dos coliformes totais nos *sashimis*. Para coliformes termotolerantes é permitida a presença de até $1,0 \times 10^2$ NMP/g. Caso seja determinada a presença de *E. coli*, deve constar no laudo analítico.

A enumeração elevada de coliformes totais indica falhas higiênicas na cadeia produtiva (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Neste estudo, as amostras 2 e 3 tiveram elevada enumeração de coliformes totais ($1,10 \times 10^3$ NMP/g). Todas as amostras apresentaram resultados positivos para a enumeração de coliformes termotolerantes, mas somente a amostra 7 teve enumeração de coliformes termotolerantes acima do permitido ($1,18 \times 10^2$ NMP/g) e portanto estava imprópria para o consumo.

Resultados parecidos foram obtidos por Moura Filho et al. (2007), que analisaram *sashimis* de atum comercializados na região metropolitana de Recife e relataram que, apesar de verificar a presença de coliformes termotolerantes em todas as amostras, nenhuma das amostras excedeu o limite máximo estabelecido pela legislação brasileira, porém em duas das 30 amostras foi detectada a presença de *E. coli*.

Outros estudos relataram contagens mais elevadas de coliformes termotolerantes em amostras de *sashimis*. Resende et al. (2009) ao analisarem amostras de *sushis* e *sashimis* na cidade de Brasília, observaram que 25% das amostras apresentaram valores acima do permitido em relação à população coliformes termotolerantes. No estudo de VALANDRO et al. (2011), 25% das amostras de *sashimis* (27 amostras de 108) coletadas em seis diferentes estabelecimentos apresentaram níveis de coliformes termotolerantes acima do permitido, sendo consideradas impróprias para consumo.

5.3 Pesquisa de *Salmonella* spp. nas amostras de *sashimis*

O gênero *Salmonella*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é constituído por bactérias Gram-negativas, geralmente móveis, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, não fermentadoras de lactose e produtoras de gás sulfídrico. Crescem no intervalo de temperatura entre 5°C e 47°C, sendo a ótima entre 35°C e 37°C e pH entre 4,0 e 9,0, sendo ideal 7,0. O gênero *Salmonella* possui duas espécies: *S. entérica*, com seis subespécies e *S. bongori*. Amplamente distribuídas na natureza, seus principais reservatórios naturais são o trato intestinal de mamíferos, aves e répteis. Podem alcançar o ambiente aquático através da contaminação fecal e, desta forma serem detectadas em peixes e produtos pesqueiros (FORSYTHE, 2002; FRANCO & LANDGRAF, 2008; OPAS/INPPAZ, 2005; VIEIRA et al., 2004).

A bactéria é sensível ao calor, não sobrevivendo à temperatura superior a 70°C, no entanto a termo-resistência pode incrementar-se com menor coeficiente de água. A inativação ocorre rapidamente em temperatura de pasteurização em alimentos com atividade de água superior a 0,95. Atividades de água inferiores aumentam a termo-resistência (RODRIGUES, 2005). Como o calor é eficiente na destruição desta bactéria, alimentos submetidos a altas temperaturas não costumam oferecer risco. A transmissão de *Salmonella entérica* ao homem ocorre pela ingestão de alimentos, sobretudo de origem animal, insuficientemente cozidos ou crus (carnes, ovos, leite). Aliado a esta condição, a falta de higiene dos locais de armazenamento e processamento, de utensílios e de equipamentos, bem como a falta de treinamento dos manipuladores em boas práticas de fabricação, constituem

fatores determinantes em surtos de salmonelose (FRANCO & LANDGRAF, 2008; GERMANO & GERMANO, 2008; SILVA JR, 2001).

A tabela 6 apresenta os resultados da pesquisa de *Salmonella* spp. nas amostras de *sashimis*.

Tabela 6. Pesquisa de *Salmonella* spp. nas amostras de *sashimis*

Amostras de <i>sashimis</i>	Agar SS* (Suspeita de <i>Salmonella</i> spp.)	Agar TSI** (Suspeita de <i>Salmonella</i> spp.)
Amostra 1	Negativo	---
Amostra 2	Suspeito	Negativo
Amostra 3	Negativo	---
Amostra 4	Suspeito	Negativo
Amostra 5	Suspeito	Negativo
Amostra 6	Suspeito	Negativo
Amostra 7	Negativo	---

* Amostras suspeitas de serem *Salmonella* spp. no Agar SS: colônias não fermentadoras de lactose e/ou com pigmento negro

** Amostras suspeitas de serem *Salmonella* spp. no Agar TSI: superfície do meio vermelha e a base negra

A legislação brasileira (BRASIL, 2001) estabelece ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de amostras de *sashimis*. Neste estudo, não houve detecção de *Salmonella* spp. nas amostras de *sashimis*. As amostras 2, 4, 5 e 6 tiveram apenas suspeita de *Salmonella* spp. e após transferir para o meio Agar TSI a suspeita não foi confirmada, assim em nenhuma amostra teve a necessidade de se realizar a análise molecular.

Resultados similares foram obtidos nos estudos de LIMA et al. (2009) e MARTINS (2006), sendo que não houve isolamento de bactérias do gênero *Salmonella* spp. nas amostras analisadas de *sashimis*. No estudo de VALLANDRO et al. (2011), apesar do risco demonstrado pela presença desses micro-organismos, também não foram encontradas bactérias do gênero *Salmonella* spp. nas amostras de *sashimis* analisadas.

KUMAR et al. (2003) evidenciaram a presença de *Salmonella* spp., em peixes, mas acreditam que a incidência de bactérias deste gênero em pescados seja oriunda de contaminação durante o processamento e manipulação, como também

relatado por ZHAO et al. (2003). BASTI et al. (2006), em estudo com peixes, não identificaram micro-organismos do gênero *Salmonella* na microbiota. Estes estudos indicam que a presença de *Salmonella* spp. em pescados seja devido a falta de controle e higiene no processo de manipulação.

5.4 Contagem de *Staphylococcus aureus* nas amostras de sashimis

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, imóveis, agrupados de forma irregular ou semelhante a cachos de uva, pertencentes à família *Micrococcaceae*. Anaeróbios facultativos, essas bactérias fermentam a glicose com produção de ácido, tanto em aerobiose como em anaerobiose, o que os diferencia dos micro-organismos do gênero *Micrococcus*, que só a fermentam a glicose em aerobiose. Tradicionalmente, os estafilococos são divididos em duas categorias: coagulase positivos e coagulase negativos. Essa divisão está baseada na capacidade de coagular o plasma, considerada uma importante propriedade associada com a patogenicidade. Algumas cepas produzem enterotoxina termoestável, responsável no homem, pelos quadros de intoxicação alimentar (ICMSF, 2002; FORSYTHE, 2002; SANTOS, 2006; VIEIRA et al., 2004).

As bactérias desse gênero são mesófilas, apresentando temperatura de crescimento na faixa de 7°C a 47,8°C, com o ótimo na faixa de 30°C e 37°C, enquanto suas enterotoxinas são produzidas preferentemente entre 40-45°C. Enterotoxinas termorresistentes são produzidas em alimentos que permanecem neste intervalo de temperatura por período superior a quatro horas. O *Staphylococcus aureus* apresenta grande importância em saúde pública, em particular na área de vigilância sanitária de alimentos. Além de ser um dos mais freqüentes causadores de surtos de toxinfecção alimentar, pode muitas vezes dar origem a infecções assintomáticas devido ao seu alto poder colonizador em diferentes regiões do organismo (GERMANO & GERMANO, 2008; FDA, 2005; MARTINS, 2006; VIEIRA et al., 2004).

A Tabela 7 apresenta os resultados das contagens de bactérias *Staphylococcus aureus* nas amostras de *sashimis* deste estudo.

Tabela 7. Contagem de bactérias *Staphylococcus aureus* nas amostras de *sashimis*

Amostras de <i>sashimis</i>	Agar sal manitol e coloração de gram (<i>Staphylococcus aureus</i>)	
	UFC/g	Log UFC/g ± DP
Amostra 1	9,66 x 10 ²	2,95 ± 0,22
Amostra 2	ND	ND
Amostra 3	1,33 x 10 ²	2,10 ± 0,17
Amostra 4	5,33 x 10 ²	2,72 ± 0,10
Amostra 5	6,00 x 10 ³	3,73 ± 0,26
Amostra 6	ND	ND
Amostra 7	6,33 x 10 ³	3,80 ± 0,04

Os resultados foram expressos como média de análises em triplicata;

DP = desvio padrão; ND = não detectado

Os valores máximos permitidos para contagem de *Staphylococcus aureus* em amostras de *sashimis* na legislação brasileira (BRASIL, 2001) são de 5,0x10³ UFC/g. Foi possível observar nesse estudo que cinco das sete amostras analisadas apresentaram cepas de *S. aureus*, com contagens de 1,33x10² a 6,33x10³UFC/g. As amostras de *sashimis* 5 e 7 apresentaram contagem de *Staphylococcus aureus* acima dos valores permitidos na legislação brasileira e portanto estavam impróprias para o consumo.

Somente duas amostras de *sashimis* analisadas neste estudo não apresentaram cepas de *S. aureus*, indicando para a maioria das amostras mostraram condições higiênicas inapropriadas, pois o *sashimi* sofre intensa manipulação durante seu preparo, assim, a manipulação é o principal fator que determina a presença de *S. aureus* nesse tipo de alimento, uma vez que esta bactéria pode estar presente nas mãos e mucosas oro-nasal dos manipuladores (SIMON e SANJEEV, 2007;VALANDRO et al., 2011).

No estudo de MALAVOTA et al. (2009) as contagens de *S. aureus* variaram de 0 a 5,04 log UFC/g nas amostras de *sashimis*, tendo sido isoladas cepas de *S. aureus* em 26% das amostras, sendo que 3,1% dessas estavam com valores acima

do permitido pela legislação. Martins (2006), avaliando 20 amostras de *sashimis*, oriundos de estabelecimentos no município de São Paulo, obteve resultados positivos para *S. aureus* em nove amostras, sendo que três amostras (15%) estavam com contagem acima do permitido. Resultado semelhante foi encontrado por Vieira et al. (2007) em 32 amostras de *sushi* e *sashimis* analisadas em dois restaurantes da cidade de Fortaleza, Ceará. Os resultados detectaram que 15,6% das amostras de *sashimi* estavam com contagens de *S. aureus* acima do permitido. Ao contrário, Resende et al. (2009), relatam que das 87 amostras analisadas de *sushis* e *sashimis* comercializados em restaurantes de Brasília, apenas uma apresentou contagens de *S. aureus* acima do limite permitido.

Segundo Martins (2006), a ocorrência de *S. aureus* é esperada em alimentos que não sofreram tratamento térmico suficiente para sua destruição ou que foram manipulados e/ou refrigerados inadequadamente. Hábitos de higiene pessoal durante a manipulação e comercialização, tais como lavagem das mãos, uso de máscaras e ausência de objetos de adorno são medidas que podem contribuir para a obtenção de produtos de melhor qualidade microbiológica (GERMANO e GERMANO, 2008). De acordo com VALANDRO et al. (2011), o treinamento dos manipuladores observado em seu estudo corroborou com a baixa contagem de estafilococos encontrada nos *sashimis*, provavelmente por reflexo de uma higiene pessoal apropriada.

5.5 Análises moleculares

A análise molecular para detecção de *E. coli* revelou que duas colônias isoladas da amostra 7, já classificada anteriormente como imprópria pelo excesso do coliformes termotolerantes, foram positivas para a presença do gene *EutC* (figura 3).



Figura 3. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *EutC* de *E. coli*. 100pb = marcador de 100 pb; AP44 e AP45 = amostras deste estudo com amplicons de *EutC*(113 pb); CN = Controle Negativo; CP= Controle positivo ATCC 29213; MA51 = controle interno do laboratório.

Quanto à análise molecular das colônias suspeitas de *S. aureus*, foi observado todas as onze colônias isoladas das amostras 1, 3, 4, 5 e 7 foram confirmadas na análise de PCR para a presença do gene *entC*, ou seja, são potenciais produtoras de enterotoxina C, conforme descrito na tabela 8 e figura 4.

Tabela 8. Identificação por meio de PCR de bactérias de *Staphylococcus aureus* isoladas das amostras de *sashimis*

Número da colônia	Amostra	Resultado Molecular
AP15	5	<i>S. aureus</i> +
AP16	5	<i>S. aureus</i> +
AP17	5	<i>S. aureus</i> +
AP18	1	<i>S. aureus</i> +
AP19	1	<i>S. aureus</i> +
AP20	3	<i>S. aureus</i> +
AP21	3	<i>S. aureus</i> +
AP22	4	<i>S. aureus</i> +
AP23	4	<i>S. aureus</i> +
AP48	7	<i>S. aureus</i> +
AP49	7	<i>S. aureus</i> +
CP	Controle Positivo S. aureus ATCC 33862	<i>S. aureus</i> +
SA26	Controle Positivo	<i>S. aureus</i> +
SA27	Controle Positivo	<i>S. aureus</i> +
SA28	Controle Positivo	<i>S. aureus</i> +
SA30	Controle Positivo	<i>S. aureus</i> +
SA31	Controle Positivo	<i>S. aureus</i> +
SA32	Controle Positivo	<i>S. aureus</i> +
SA33	Controle Positivo	<i>S. aureus</i> +
SA34	Controle Positivo	<i>S. aureus</i> +
CN	S. aureus -	<i>S. aureus</i> -

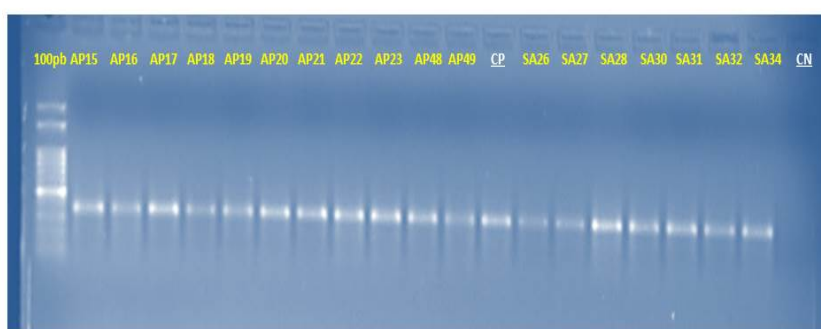


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *entC* de *S. aureus*. 100pb = marcador de 100 pb; PA1 a PA24 = amostras deste estudo com amplicons de *entC*(401 pb); CP= controle positivo ATCC 33862; BEL11 a BEL74 = controles internos do laboratório; CN= Controle Negativo.

6. CONCLUSÃO

O consumo de comida japonesa é crescente e notável pela população brasileira, através dos inúmeros restaurantes que oferecem esse tipo de serviço. Com isso é necessário que a fiscalização seja feita regularmente para garantir a qualidade e segurança desses alimentos oferecidos ao consumidor. O pescado cru que é a base da comida japonesa pode ser veiculador de uma grande variedade de micro-organismos, que podem oferecer riscos à saúde do consumidor.

Neste estudo, foram realizadas as análises microbiológicas de sete amostras de *sashimis* à base de atum, anchova e tilápia comercializados em restaurantes especializados em culinária japonesa na cidade de Brasília- DF. As amostras 2 e 3 tiveram elevada enumeração de coliformes totais e a amostra 7 teve enumeração de coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação brasileira. Através da análise molecular foi confirmada a presença do gene EutC de *E. coli* na amostra 7 que, portanto, estava imprópria para o consumo. Quanto a contagem de *S. aureus*, cinco das sete amostras analisadas apresentaram cepas de *S. aureus*, sendo confirmadas nas análises de PCR a presença do gene entC, indicando que as cepas eram potenciais produtoras de enterotoxina C. As amostras de *sashimis* 5 e 7 apresentaram contagem de *S. aureus* acima dos valores permitidos na legislação brasileira e portanto estavam impróprias para o consumo.

Embora a maioria das amostras de *sashimis* deste estudo estivesse própria para o consumo, a realização de pesquisas como essa permite uma melhor análise da qualidade higiênica sanitária desses alimentos prontos para o consumo. Os restaurantes que comercializam esse tipo de alimento devem treinar os manipuladores, colocar avisos da forma correta de higienização das mãos, equipamentos e superfícies, fazer o controle de qualidade da água do gelo e bancadas de manipulação e exigir que as autoridades sanitárias reforcem o monitoramento e controle desses itens para evitar riscos à saúde do consumidor.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCJ – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CULINÁRIA JAPONESA. Disponível em: <www.baressp.com.br>.

ALVES, C. L. et al. Comercialização de pescado no distrito Federal: Avaliação das Condições. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, nº 102/103, p. 41 – 49, 2002.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Manual de Microbiologia Clínica para Serviços de Saúde**, Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos, Módulo IV, Brasília, 2010.

BALBANI, A. P. S & BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. Revisão e Ensaio. **Pediatria (São Paulo)**, v. 23, n. 4, p.320-8, 2001.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no. 216, de 15 de Setembro de 2004. **Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas para o Serviços de Alimentação**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, D.F., 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.º 12 de 02 de janeiro de 2001, **Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. Brasília, DF, 2001.

CAPUANO, D.M.; OKINO, M.H.T.; DE MATTOS, H.R.M.; TORRES, D.M.A.G.V. **Diphyllobothriasis: a case report of a human infection in Ribeirão Preto, SP, Brazil**. RBAC, v.39, n.3, p.163-164, 2007.

CARROLL, W.F. Sushi; **Globalization through food culture; towards study of global food networks**. Education Research, v.2, p.451-456, 2009.

CEPSUL - Centro de Pesquisa e Gestão dos Recursos Pesqueiros do Litoral Sudeste e Sul. 2009. **Relatório sobre a reunião técnica para o ordenamento da pesca de anchova (*Pomatomussaltatrix*) nas regiões sudeste e sul do Brasil**. Disponível em:<http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/relatorio_de_ordenamento/enchova/rel_2009_prel_anchova.pdf>.

CORREIA, M.; RONCADA, M. J., Características microscópicas de queijos prato, mussarela e mineiro comercializados em feiras livres da Cidade de São Paulo. **Revista Saúde Pública**. V. 31; 296-301p.; 2002.

CWIERTKA, K.J. From ethnic to hip: circuits of japanese cuisine in Europe. **Food and Foodways**, n.13, v.4, p.241-272, out. 2005.

EDWARDS, P.A. **Global sushi; eating and identity**. PGDT, v.11. n.1, p.211-225, 2013.

FAO (Food and Agriculture Organization) – Committee on Animal Origin Foods Food Sanitation Investigation Council. **Report on preventive measures for *Vibrio parahaemolyticus* foodborne infections**, 2000. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/about/cofi/en>>.

FAO - Fisheries and Aquaculture Department, **Species Fact Sheets *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)**, 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/species/3217/en>>.

FAO - Fisheries and Aquaculture Department, **Species Fact Sheets *Pomatomussaltatrix* (Linnaeus, 1766)**, 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/species/3102/en>>.

FAO (Food and Agriculture Organization). Documento técnico sobre as pescas. **Garantia da qualidade dos produtos da pesca**, 1997.

FDA (Food and Drug Administration). Center for food safety and applied nutrition. **Food borne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook**. 2005

FENG, P.; WEAGENT, S. D; GRANT, M. A. **Bacteriological Analytical Manual Online: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria**, 2002. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>>.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

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

FRITSCH, J. A hora e a vez do peixe. **Revista Higiene Alimentar** 2004; 116/117. Disponível em: <<http://www.higienealimentar.com.br/revista/ed117/edito.htm>>.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, P. M. L. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2008. 986 p.

GIAMPIETRO, A.; REZENDE-LAGO, N. C. M. Qualidade do gelo utilizado na conservação de pescado fresco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n. 3, p. 505-508, 2009.

GRAM, L.; DALGAARD, P., Fish spoilage bacteria – problems and solutions. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 262-266, 2002.

HAMADA-SATO, N.; USUI, K.; KOBAYASHI, T.; IMATA, C., WATANABE, E. Quality assurance of raw fish base on HACCP concept. **Food Control**, Japan, v.16, p.301-307, 2005.

HOLZMANN, S. N. **Sushi: sabor milenar**. São Paulo: Publifolha, 2006.

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

HÜTTEN, G.C. HACCP na produção e distribuição de salpicão de frango em um restaurante “self-service”: metodologia e ocorrência de coliformes fecais, *E. coli* e *S. aureus*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2000. 132p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Brasil 500 anos. Território Brasileiro e Povoamento – Japoneses – Razões da emigração japonesa. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>.

ICMSF – Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganisms in Foods 7: Microbiological testing in food safety management**. New York: Kluwer Academic, 2002.

ICMSF. **Microorganisms in foods 6: microbial ecology of food commodities**, 2 ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2005.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6º ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KUMAR H.S, SUNIL R., VENUPOGAL M.N., KARUNASAGAR I. Detection of *Salmonella* spp. In tropical seafood by polymerase chain reaction. **Internacional Journal of Food Microbiology** 2003 Nov: 88 (1): 91-95.

LIMA, R. M. T. et al. **Avaliação microbiológica de sushis e sashimis comercializados na cidade do Recife-PE**. Pernambuco, 2009. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Disponível em: <<http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0620-1.pdf>>.

MALAVOTA, L. C. M.; COSTA, J. C. B.; JARDIM, M. F.; OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, V. M. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella* spp em “sashimis” comercializados em restaurantes no município do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 16, n. 2, p. 89-94, maio/ago. 2009.

MARTINS, F. O. **Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de preparações (sushi e sashimi) a base de pescado cru servidos em bufês na cidade de São Paulo**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2006.

MATTÉ, G.R. **Estudo de *Vibrio* spp. potencialmente patogênicos através de métodos moleculares**. Tese de Livre-Docência – Faculdade de Saúde Pública (FSP)/USP). São Paulo; 2003.

MENEZES, F.G.R; SILVA, C.M; CARVALHO, F.C.T; SOUSA, D.B.R e VIEIRA, R.H.S.F. ***Salmonella* spp. e *Staphylococcus coagulase positiva* em “sushis” e “sashimis” comercializados na cidade de Fortaleza, Ceará, 2006.**

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA**. Aprovado pelo Decreto nº 30.691 de 29/03/1952, alterado pelos Decretos nºs 1.255 de 25/06/1962, 1.236 de 02/09/1994, 1.812 de 08/02/1996 e 2.244 de 04/06/1997. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1997.

MOURA FILHO, L. G. M. et al. Enumeração e pesquisa de *Vibrio spp.* e coliformes totais e termotolerantes em *sashimis* de atum e vegetais comercializados na região metropolitana do Recife, Estado de Pernambuco, **Acta Scientiarum Technology**, v. 29, n. 1, p. 85-90, 2007.

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2010**. Brasília, 2012. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br>>.

OPAS/INPPAZ - Organização Pan-Americana da Saúde. HACCP: **Ferramentas Essenciais para Inocuidade dos Alimentos**. Buenos Aires, Argentina: OPAS/INPPAZ; 2005.

ORDOÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PACHECO, T.A., LEITE, R.G.M., ALMEIDA, A.C., SILVA, N.M.O., FIORINI, J.E.. Análise de coliformes e bactérias mesófilas em pescado de água doce. **Revista Higiene Alimentar**, n.18, v. 116/117, p.68-72, 2004.

PIMENTEL, L.P.S., PANETTA, J.C.. Condições higiênicas do gelo utilizado na conservação de pescado comercializado em supermercados da grande São Paulo. Parte 1, resultados microbiológicos. **Revista Higiene Alimentar**. n,17, v.106,p. 56-57, 2003.

PORTAL BRASIL. Produção de peixes no Brasil cresce com apoio de pesquisas da Embrapa. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2017/01/producao-de-peixes-no-brasil-cresce-com-apoio-de-pesquisas-da-embrapa>>.

RAMIREZ, Z. R. S. **Análise da composição e distribuição geográfica dos atuns da costa brasileira (Perciformes: Scombridae: Thunnini)**, Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu, 2015.

REIJ MW, DEN AANTREKKER ED. Recontamination as a source of pathogens in precessed foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 1-11, 2004.

RESENDE, A.; SOUZA, J. R.; OLIVEIRA, Y. S. Análise microbiológica de *sushis* e *sashimis* comercializados em restaurantes de Brasília no período de 2001 a 2004. **Revista Higiene Alimentar**, v. 23, p. 164-70, 2009.

RODRIGUES, B. L. et al., Qualidade físico-química do pescado utilizado na elaboração de *sushis* e *sashimis* de atum e salmão comercializados no município do Rio de Janeiro, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1847-1854, 2012.

RODRIGUES, D.P. **Ecologia e prevalência de *Salmonella* spp. em aves e material avícola no Brasil**. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Santos. Anais...Santos: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia avícolas, 2005, 2v. V.2, p. 223-237.

SANTOS, C. I. C. **Avaliação microbiológica de *sashimi* (microbiota deteriorativa e patogênica)**.90 p.,Tese de Mestrado, Universidade de Trás os Montes e Alto Douro, Portugal, 2013 a.

SANTOS, R.M. **Avaliação da qualidade higiênico-sanitaria de peixes comercializados em mercados municipais da cidade de São Paulo-SP**. 2006. 96f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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

SENAC/DN. **Elementos de Apoio para as Boas Práticas e Sistema APPCC no Setor Distribuição (Qualidade e Segurança dos Alimentos)**: SENAC. Rio de Janeiro, 2004, 275p.

SILVA JUNIOR, E.A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 4 ed. São Paulo: Varela, 2001, 475p.

SIMÕES et al. Composição físico-química, microbiológica e rendimento do filé de tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 608-613, 2007.

SIMON, S. S.; SANJEEV, S. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. **Food Control**, v. 18, n. 12, p. 1565-1568, 2007.

SOARES, C.M., GERMANO, P.M.L., Análise da qualidade microbiológica de “*sashimis*”, comercializados em “shopping centers” da cidade de São Paulo, Brasil. **Revista Higiene Alimentar**, v.18, n.116/117, jan/fev. 2004.

SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A. Aplicação do método do índice de qualidade (MIQ) para o estudo da vida útil de filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sem pele, armazenados em gelo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2289-2300, 2012.

SOULTOS, N., ABRAHIM, A.; PAPAGEORGIU, K., STESIS, V. Incidence of *Listeria* spp in fish and environment of fish markets in Northern Greece. **Food Control**. v. 18, n. 5, 2006.

TAVARES, M.; GONÇALVES, A. A. **Aspectos físico-químicos do pescado. Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação.** São Paulo: Editora Atheneu, p. 10-20, 2011.

TEDESCO, A. F.; LIMA, C.; LIMA, Carina ; SILVA, Fabiola; **A importância da higiene pessoal dos manipuladores dentro de uma Unidade de Alimentação e Nutrição;** Março 2005. Disponível em: <<http://www.unibem.br/cursos/nutricao/Kath/8.doc>>.

TORRES, E.A.F.S.; SAMPAIO, G.R.; CASTELLUCCI, C.M.; ABREU, E.S.; CARDOSO, M.A. Low levels of cholesterol/saturated fat index (CSI) in a Japanese-Braslian diet. **Nutrition & Food Science** , v.35, n 5, p.324-329, 2005.

VALANDRO et al. Avaliação da qualidade microbiológica de *sashimis* à base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 2, p. 144-150, 2011.

VIEIRA, R. H. S. F. et al. *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva em *sushi* e *sashimi* preparados em dois restaurantes da cidade de Fortaleza, Ceará, **Boletim Técnico Científico do CEPENE**, v. 15, n. 1, p. 9-14, 2007.

VIEIRA, R.H.S.F., RODRIGUES, D.P., BARRETO, N.S.E, SOUZA, O.V., TÔRRES, R.C.O., RIBEIRO, R.V. e col. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado; teoria e prática.** São Paulo: Varela; 2004.

YANO, Y., YOKOYAMA, M., SATO, I., OIKAWA, H., CHEN, S. S.. Occurrence of *Vibrio vulnificus* in fish and shellfish available from markets in China. **Journal of Food Protection** n. 67, v.8, p.1617-1623, 2004.

ZHAO S., DATTA A.R., AYERS S., FRIEDMAN S., WALKER R.D., WHITE D.G. Antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from imported foods. **Internacional Journal of Food Microbiology** 2003 July; 84 (1): 87-92.