

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO

Curso de Medicina Veterinária

BRUNA BARROS LINS SOUZA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS
DE SASHIMIS À BASE DE SALMÃO PREPARADOS EM
RESTAURANTES DA REGIÃO SUL DA CIDADE DE SÃO PAULO –
SP**

SÃO PAULO

2016

BRUNA BARROS LINS SOUZA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS
DE SASHIMIS À BASE DE SALMÃO PREPARADOS EM
RESTAURANTES DA REGIÃO SUL DA CIDADE DE SÃO PAULO –
SP**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária sob a orientação da Prof. Mestra Renata Savarino Levenhagen

SÃO PAULO

2016

BRUNA BARROS LINS SOUZA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE
SASHIMIS À BASE DE SALMÃO PREPARADOS EM RESTAURANTES DA
REGIÃO SUL DA CIDADE DE SÃO PAULO – SP**

Trabalho de conclusão de curso apresentado para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária da Universidade de Santo Amaro – UNISA sob orientação da Prof. Mestra Renata Savarino Levenhagen da Área de Concentração _____.

Data de Aprovação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Mestra Renata Savarino Levenhagen

(Prof. _____)

CONCEITO FINAL: _____

Dedico este trabalho aos meus pais, minha irmã e ao meu cachorro, por toda ajuda, companheirismo e por me incentivarem e fazer com que tudo isso se tornasse possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as graças alcançadas, pelas conquistas, pela benção, pela vida e principalmente minha família e cachorro.

Agradeço a minha família, meus pais Flavio e Marcia, a minha irmã Flavia, pelo companheirismo, por toda atenção e apoio em todos os momentos, principalmente nos momentos difíceis. Por sempre me incentivarem a seguir a carreira que escolhi, mesmo com todas as dificuldades e dúvidas. E por sempre demonstrarem interesse pelo meu trabalho, e todo o seu desenvolvimento.

Agradeço ao meu cachorro Lucky, por ter ficado ao meu lado por 18 anos, por ter sido o meu maior e melhor companheiro, me fazendo escolher esta profissão. Por sempre me acalmar nos piores momentos, e fazer dos meus dias os mais felizes durante sua existência.

Agradeço também as minhas primas Danielle e Lana, por sempre estarem ao meu lado e por me distraírem quando mais precisava. Além de sempre demonstrarem interesse pelo desenvolvimento do meu trabalho.

Aos meus amigos, Arthur, Fabíola, por sempre estarem ao meu lado, me aconselhando e apoiando, desde antes da faculdade. A Luísa e Nathalie, por sempre estarem ao meu lado, pela amizade de 16 anos por sempre me apoiarem e confiarem em mim, sempre presentes nos momentos mais importantes, e me fazerem pensar no futuro de outra forma.

Agradeço aos meus amigos da faculdade, Caio por sempre me animar, e tornar os dias mais alegres. Amanda por me ajudar durante o desenvolvimento do projeto no laboratório e me fazendo companhia. Tamires, Natália e Victor por sempre me alegrarem, incentivarem e distraírem quando necessário. Agradeço imensamente a Caroline Sayuri, por todo companheirismo durante todos os anos da faculdade, por todos os ensinamentos e apoio. Agradeço a Carla Cruz por estar ao meu lado desde a primeira semana de aula na faculdade, por todos os ensinamento, companheirismo e risadas que foram muitas.

Agradeço imensamente a minha professora e orientadora Renata Savarino por me ajudar a tornar o meu sonho de trabalhar com pesquisa microbiológica em alimentos possível. Agradeço também por todos os conselhos, conversas e apoio,

tornando os dois últimos anos da faculdade os melhores. Agradeço por toda ajuda durante o desenvolvimento do projeto de iniciação e TCC. E a professora Amane Gonçales pelos ensinamentos, oportunidades, ajuda e apoio.

*“All our dreams can come true if we have the
courage to pursue them”*

Walt Disney

RESUMO

Visando conhecer a segurança do *sashimi* preparado à base de salmão cru fornecido em restaurantes e dos riscos potenciais ao consumidor, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de amostras de *sashimis* de salmão, selecionadas por conveniência, preparados em restaurantes especializados e não especializados em culinária japonesa da região sul da cidade de São Paulo, através de pesquisa de coliformes totais e termotolerantes, presença e quantificação de *Staphylococcus* spp.. Para o estudo foram coletadas amostras de *sashimis* de quatro estabelecimentos especializados e seis não especializados, gerando um total de dez estabelecimentos e 84 amostras. As amostras foram acondicionadas em recipientes isotérmicos com gelo e transportadas para o Laboratório de Alimentos e Saúde Pública da Universidade de Santo Amaro. Essas amostras foram analisadas em períodos inferiores a 12 horas para minimizar o risco de alteração gerada pela análise e não pela contaminação inicial. Os resultados mostraram que 77,38% das amostras analisadas estavam dentro do padrão aceito pela legislação vigente em relação aos coliformes termotolerantes. E apenas 26,19% das amostras coletadas estavam dentro do valor aceito pela legislação vigente para *Staphylococcus* spp. coagulase positiva. Comprovando assim a contaminação de *sashimis* tanto por coliformes termotolerantes quanto por *Staphylococcus* spp. coagulase positiva.

Palavras-chave: *sashimi*, contaminação, *Staphylococcus* spp., coliformes termotolerantes

ABSTRACT

Aiming to meet the safety *sashimi* prepared on the basis of raw salmon provided in restaurants and the potential risks to consumers, the aim of this study was to evaluate the microbiological quality of salmon *sashimi* samples, selected for convenience, prepared in restaurants specialized and not specialized in Japanese cuisine from the south of the city region of São Paulo. Through total coliforms research and thermotolerant, presence and quantifying of *Staphylococcus* spp.. For the study *sashimis* samples were collected from four specialized establishments and six non-specialized, total of ten establishments and 84 samples. The samples were stored in vacuum vessels with ice and transported to the Food Laboratory and Public Health of University Santo Amaro. These samples were analyzed in periods shorter than 12 hours to minimize the risk of alteration generated by analysis and not by the initial contamination. The results showed that 77.38% of samples analyzed for fecal coliforms were within the accepted standard by law. And only 26.19% of the samples were within the accepted value by law for *Staphylococcus* spp. coagulase positive. Thus proving the contamination *sashimis* both fecal coliforms as *Staphylococcus* spp. coagulase positive.

Keywords: *sashimi*, contamination, *Staphylococcus* spp, coliform thermotolerant

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Resultados negativo e positivo, respectivamente, do teste para coliformes.
.....21
- Figura 2 – Crescimento bacteriano, realizado em meio ágar Baird-Parker adicionado de Egg Yolk enriquecido com Telurito.....22
- Figura 3 – Placa de Petri contendo plasma de coelho liofilizado e colônia coagulada.
.....23
- Figura 4 – Imagem da colônia de *Staphylococcus* spp. fixada e corada, observada pelo microscópio (aumento de 200 x).....24
- Figura 5 – Lâmina e alça de platina contendo peróxido de hidrogênio 3% e colônia de *Staphylococcus* spp. demonstrando resultado positivo para o teste de catalase.25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- População de coliformes totais e termotolerantes (NMP/g) em amostras de sashimi de salmão, colhidas de restaurantes especializados e não especializados em culinária japonesa, da região sul da cidade de São Paulo, SP.27

Tabela 2- População de *Staphylococcus* spp. das amostras de sashimi de salmão, colhidas em estabelecimentos especializados e não especializados em culinária japonesa.....28

Tabela 3- Testes confirmatórios, realizados nas populações de *Staphylococcus* spp. encontradas em amostras de sashimi de salmão, colhidas em restaurantes especializados e não especializados em culinária japonesa.....29

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Comparativo dos resultados obtidos nas análises.....	30
---	----

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 Área do estudo	18
3.2 Colheita das amostras	18
3.3 Pesagem das amostras.....	18
3.4 Análises microbiológicas	19
3.4.1 Avaliação da presença de coliformes totais e coliformes termotolerantes	20
3.4.2 Avaliação da presença de Estafilococos coagulase positiva	21
4. RESULTADOS.....	25
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

O termo pescado refere-se a peixe, crustáceo, molusco, anfíbio, quelônio e mamífero de água doce ou salgada, utilizados para alimentação humana. (1)

Pescado fresco é aquele que não sofreu qualquer processo de conservação, exceto pelo resfriamento, e que mantém suas características essenciais inalteradas. O pescado, de um modo geral, é denominado pela expressão “fresco”, que se refere ao fato de não ter sido armazenado, podendo, no entanto, ter sofrido a proteção de gelo. Pode ter a classificação de “pescado resfriado” que é aquele armazenado sob refrigeração ($-0,5$ a $-2,0^{\circ}\text{C}$) e “pescado congelado” que é aquele armazenado em temperaturas inferiores a -25°C . (1,2)

Nos últimos anos tem-se observado mudança no perfil alimentar da população, o que, associado à oferta de pescado de qualidade no mercado interno, pode direcionar o consumo, em especial pela oferta de novas formas de apresentação deste alimento. O hábito de ingerir pescado cru, em pratos como o *sashimi* e *sushi*, é de introdução recente no cardápio dos estabelecimentos de alimentação nas grandes cidades brasileiras. As lojas especializadas em *sashimi* e *sushi*, anteriormente restritas a regiões onde predominavam imigrantes asiáticos, tornaram-se comuns, estando presentes em quase todos os *Shopping Center*, dentro da categoria *fast-food*, existindo, até mesmo, lojas especializadas na modalidade de entrega em domicílio (*delivery*) (3).

O *sashimi* é um alimento típico da culinária japonesa preparada a partir de peixes e frutos do mar frescos, servidos em fatias finas. Os frutos do mar geralmente são servidos cozidos, porém os peixes como salmão, atum e peixe branco, são servidos crus (4). O salmão (*Oncorhynchus* spp) é um dos peixes mais utilizados como matéria-prima pelos estabelecimentos que comercializam comida japonesa e é o principal pescado utilizado na preparação de *sashimi*. O aumento do consumo de peixe sob a forma de *sashimi* e *sushi* faz crescer proporcionalmente a preocupação dos órgãos ligados à Saúde Pública com a qualidade higiênico-sanitária destes alimentos, pois não sofrem nenhum tipo de tratamento térmico capaz de reduzir ou eliminar possíveis micro-organismos patogênicos, podendo desta forma veicular doenças (5).

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) constituem um grupo de doenças, na qual o alimento contaminado é o mais importante veículo transmissor do agente patogênico (6). De modo geral, as DTAs são identificadas por sintomas gastrointestinais, sobretudo diarreia, vômitos e dores abdominais que podem aparecer entre trinta minutos e oito horas após o consumo do alimento contaminado. Estes sintomas persistem em geral por 24 horas, mas em casos graves a desidratação pode levar ao choque hipovolêmico e ao óbito (7,8,9)

Alguns micro-organismos que podem contaminar o alimento são patogênicos, causando doença em quem os consomem, outros não causam doença nos seres humanos, mas são indicadores de condições higiênicas inadequadas, cuja presença em maior ou menor número é indício de qualidade da matéria-prima e do processamento realizado, além de sua presença sugerir a existência de outros micro-organismos patogênicos (10). Bactérias, protozoários e vírus estão entre os micro-organismos que podem causar DTAs mediante a ingestão de peixe, no entanto, as bactérias apresentam maior ocorrência e importância, sendo as únicas cujos os percentuais são limitados pela legislação para alimentos (11),

Figuram na legislação brasileira vigente entre os parâmetros a serem observados em pratos prontos para o consumo, incluindo o *sashimi*, algumas dessas bactérias de interesse para a saúde pública. São elas: os coliformes a 45°C, *Staphylococcus* spp., *Vibrio parahaemolyticus* e a *Salmonella* sp. (12).

A presença do grupo dos coliformes está diretamente relacionada com falhas no processamento e contaminação fecal recente, evidenciando o risco de ocorrência de bactérias enteropatogênicas (13).

A presença de *Staphylococcus* sp em pescado e seus subprodutos ocorre durante o processo de manipulação do alimento, sem que os alimentos sofram modificações em sua aparência ou sabor. O *Staphylococcus* sp. pode ser encontrado na pele, feridas e mucosa de boa parte da população e caso ocorra falha de higiene durante a manipulação de alimentos, pode-se encontrar quantidades de bactérias superior à permitida pela legislação vigente, levando a produção da toxina e intoxicação alimentar (14).

As bactérias abordadas neste trabalho são as *Staphylococcus* spp., que são classificadas de acordo com sua forma, arranjo e estrutura. Sua forma é esférica (coco) e estão agrupadas em cachos. Sua estrutura é formada por uma parede

espessa, constituída predominantemente de peptidoglicanos, totalizando quase 90% da sua constituição. Sendo assim denominada, bactéria Gram positiva. E os coliformes, tanto totais quanto termotolerantes, são bactérias Gram negativas e produtoras de gás. (15,16)

2. OBJETIVOS

A presente proposta teve por objetivo avaliar a qualidade microbiológica do *sashimi* à base de salmão cru, por meio da pesquisa de coliformes termotolerantes e da presença e quantificação de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva.

Avaliar o perigo de veiculação de agentes etiológicos causadores de doenças de origem alimentar pelo consumo de *sashimis*, e comparar com parâmetros de qualidades pré-estabelecidos para pescado cru pela legislação vigente.

Avaliar se existe diferença na qualidade microbiológica dos produtos comercializados em restaurantes especializados em culinária japonesa e em restaurantes não especializados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área do estudo

Para a realização do presente trabalho foram colhidas amostras de preparações de *sashimi* servidas em restaurantes especializados em culinária japonesa e em restaurantes não especializados, localizados na zona Sul do município de São Paulo.

Os estabelecimentos caracterizados como restaurantes especializados foram aqueles que serviam exclusivamente comida japonesa e como restaurantes não especializados aqueles onde as preparações eram servidas em *buffet*, juntamente com outros tipos de comida. Foram analisadas amostras de 4 estabelecimentos não especializados e 6 de especializados, totalizando 10 estabelecimentos, sendo colhidas uma média de cinco amostras de cada estabelecimento em dias diferentes, totalizando 84 amostras.

Todas as amostras foram analisadas no Laboratório de Alimentos e Saúde Pública da Universidade de Santo Amaro.

3.2 Colheita das amostras

As amostras foram colhidas e acondicionadas em sacos plásticos estéreis próprios para alimentos que por sua vez foram acondicionados em recipientes isotérmicos com gelo reciclável, e levadas ao Laboratório para as análises. O tempo transcorrido entre a colheita e processamento foi inferior a 12 horas.

3.3 Pesagem das amostras

As amostras foram homogeneizadas dentro dos sacos plásticos estéreis. Posteriormente os mesmos foram cortados, e com o auxílio de uma pinça estéril as amostras foram colocadas em uma placa de Petri estéril, sobre a balança já tarada. Pesar-se 25 g de cada amostra. Todo o processo⁴ foi realizado próximo ao fogo para evitar contaminação. Após pesada a amostra foi colocada em um Erlenmeyer

contendo água peptonada a 0,1% (diluente), e assim, iniciando-se a análise microbiológica.

3.4 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com a metodologia preconizada pela *American Public Health Association* (17) e descrita no manual de métodos de análise microbiológica de alimentos (18). Foram pesquisados *Staphylococcus* spp., coliformes totais e os coliformes termotolerantes, citados pela RDC 12/01 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em seu item “Pratos Prontos para o Consumo” (alimentos prontos de cozinhas, restaurante e similares) a base de carnes, pescados e similares crus (quibe cru, *carpaccio*, *sushi*, *sashimi*, etc.).

A interpretação das análises laboratoriais foi realizada de acordo com a RDC 12/01 da ANVISA (Quadro 1). Segundo esta resolução, são considerados produtos em condições sanitárias satisfatórios aqueles que apresentam os resultados analíticos abaixo ou igual aos limites estabelecidos para amostra indicativa ou representativa.

Quadro 1 – Quantidade de micro-organismos tolerados para pratos prontos para consumo à base de carne, pescado e similares crus, segundo a RDC 12/01 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), São Paulo – 2014.

Grupo de Alimento	Microorganismo	Tolerância para amostra indicativa ^A
Pratos prontos para o consumo à base de carnes, pescados e similares crus (quibe cru, <i>carpaccio</i> , <i>sushi</i> , <i>sashimi</i> , etc.)	Coliformes Termotolerantes	$\leq 10^2$ UFC/g
	Estafilococos coagulase positiva	$\leq 5 \times 10^3$ UFC/g

^A Quantidade de micro-organismos em número mais provável por grama (NMP/g) ou unidade formadoras de colônia por grama (UFC/g).

Fonte: Adaptado de Brasil, 2001

3.4.1 Avaliação da presença de coliformes totais e coliformes termotolerantes

A presença de coliformes totais foi avaliada por teste presuntivo enquanto o teste de coliformes termotolerantes foi por teste confirmativo, foram determinados pela técnica de fermentação em tubos múltiplos (NMP).

Para realização do teste de avaliação de presença de coliformes termotolerantes, deve-se fazer anteriormente o teste para coliformes totais. Os coliformes totais fazem parte do teste presuntivo, que demonstra se há ou não alguma contaminação por coliformes na amostra, após este teste apenas os que foram positivos passaram pelo teste de confirmação da presença de coliformes termotolerantes, que por sua vez é um teste confirmativo.

Após a homogeneização asséptica da amostra, 25g de cada amostra foi adicionado a 225mL de água peptonada estéril 0,1%, sendo esta considerada a diluição 10^{-1} . A partir desta diluição foram efetuadas diluições seriadas de razão dez até a diluição 10^{-4} . Alíquotas de 1 mL foram inoculadas em três tubos contendo 9 mL de Caldo Lauryl Sulfato Triptose estéril contendo um tubo de Durham invertido e incubadas de 35 a 37°C por 24 a 48 horas. Considerados positivos para coliformes totais os tubos que apresentaram turvação e formação de gás visível no tubo de Durham. Dos tubos que apresentaram turvação e presença de gás foi transferida uma alíquota para tubos contendo Caldo *E. coli* (EC), com tubo de Durham invertido no seu interior, os quais foram incubados de 45 a 47°C por 24 a 48 horas. Após este período considerou-se para o número mais provável (NMP) os tubos que apresentarem turvação e presença de gás. A pesquisa de *E. coli* foi realizada a partir dos tubos positivos no caldo EC. Os resultados desse teste estão ilustrados na figura 1.

Figura 1 – Resultados negativo e positivo, respectivamente, do teste para coliformes.



Legenda: 1 - Tubo com resultado negativo para teste de coliformes totais, não apresenta turvação e não apresenta produção de gás. 2 - Tubo com resultado positivo para teste de coliformes totais, apresenta turvação e produção de gás.

Fonte: Foto tirada pela autora, com autorização dos responsáveis no Laboratório de Alimentos e Saúde Pública da Universidade de Santo Amaro. (2015).

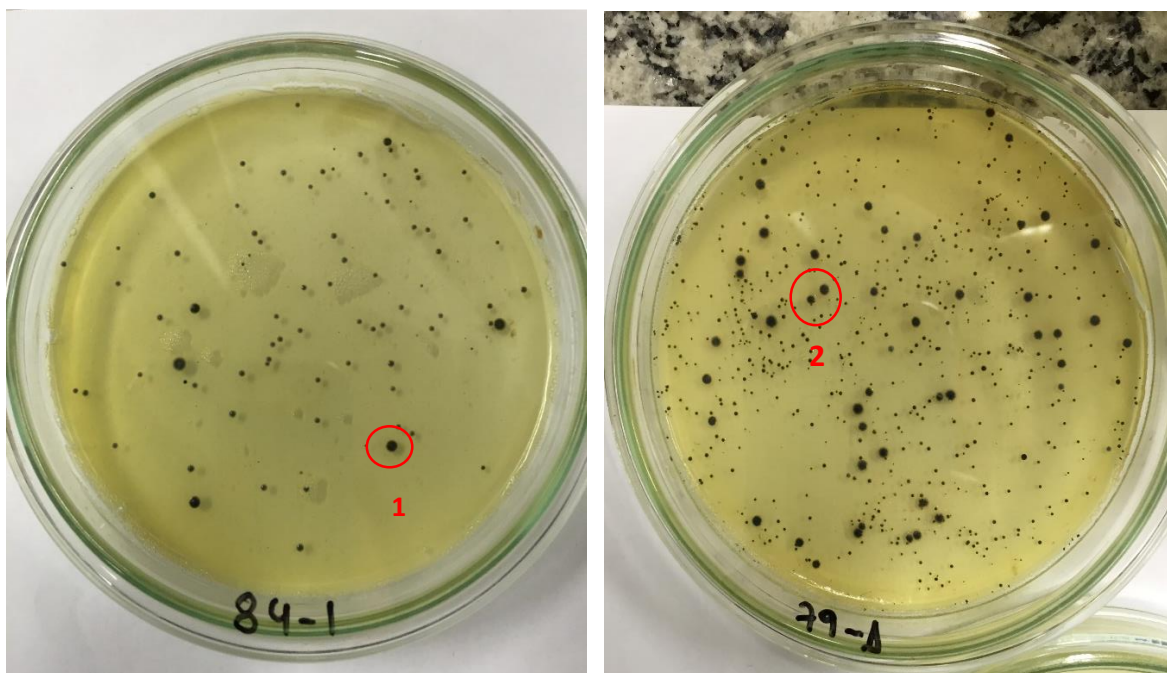
3.4.2 Avaliação da presença de *Stapylococcus coagulase positiva*

Pesou-se 25g de cada amostra, adicionados de 225mL de água peptonada 0,1%, e homogeneizados por 60 segundos, sendo esta considerada a diluição 10^{-1} . A partir desta diluição foram efetuadas diluições seriadas de razão dez até a diluição 10^{-4} em água peptonada 0,1%. Com o auxílio de pipeta estéril foi inoculado 0,1 ml de cada diluição na superfície das placas contendo ágar Baird-Parker adicionado de *Egg Yolk* enriquecido com Telurito, e espalhadas com o auxílio da alça de Drigalski estéril. As placas foram nomeadas, de acordo com a diluição inoculada em sua superfície.

Posteriormente foram incubadas invertidas em estufa a 35 a 37°C por 48 horas. Após esse período realizou-se contagem das unidades formadoras de colônia (UFC),

sendo consideradas as placas que apresentaram entre 25 a 250 UFC. De cada placa coletou-se entre 3 a 5 colônias típicas e atípicas de *Staphylococcus* spp. as quais foram submetidas à confirmação pela prova da coagulase. A figura 2 ilustra a presença das colônias de *Staphylococcus* no meio ágar Baird-Parker adicionado de *Egg Yolk* enriquecido com Telurito.

Figura 2 – Crescimento bacteriano, realizado em meio ágar Baird-Parker adicionado de *Egg Yolk* enriquecido com Telurito.



Legenda: 1 e 2 – Colônias bacteriana

Fonte: Foto tirada pela autora, com autorização dos responsáveis no Laboratório de Alimentos e Saúde Pública da Universidade de Santo Amaro. (2015).

3.4.2.1 Prova da coagulase

Após a incubação e contagem das placas, coletou-se entre 3 e 5 colônias típicas e atípicas de *Staphylococcus* spp., as quais foram submetidas à confirmação pela prova da coagulase, realizada com o plasma de coelho liofilizado, sendo considerados positivos os que apresentaram coagulação.

Em uma placa de Petri estéril foi inoculado com o auxílio de uma micropipeta 100µl do plasma de coelho liofilizado e com o auxílio de uma alça de platina retirou-

se uma colônia da placa anteriormente incubada e adicionou-se ao plasma. Quando positiva a colônia coagula, mudando a sua coloração e consistência. (Figura 3)

Figura 3 – Placa de Petri contendo plasma de coelho liofilizado e colônia coagulada.



Legenda: A seta indica colônia positiva para prova de coagulase. Esta colônia apresenta um coágulo ao seu redor.

Fonte: Foto tirada pela autora, com autorização dos responsáveis no Laboratório de Alimentos e Saúde Pública da Universidade de Santo Amaro. (2015)

3.4.2.2 Identificação de Estafilococos

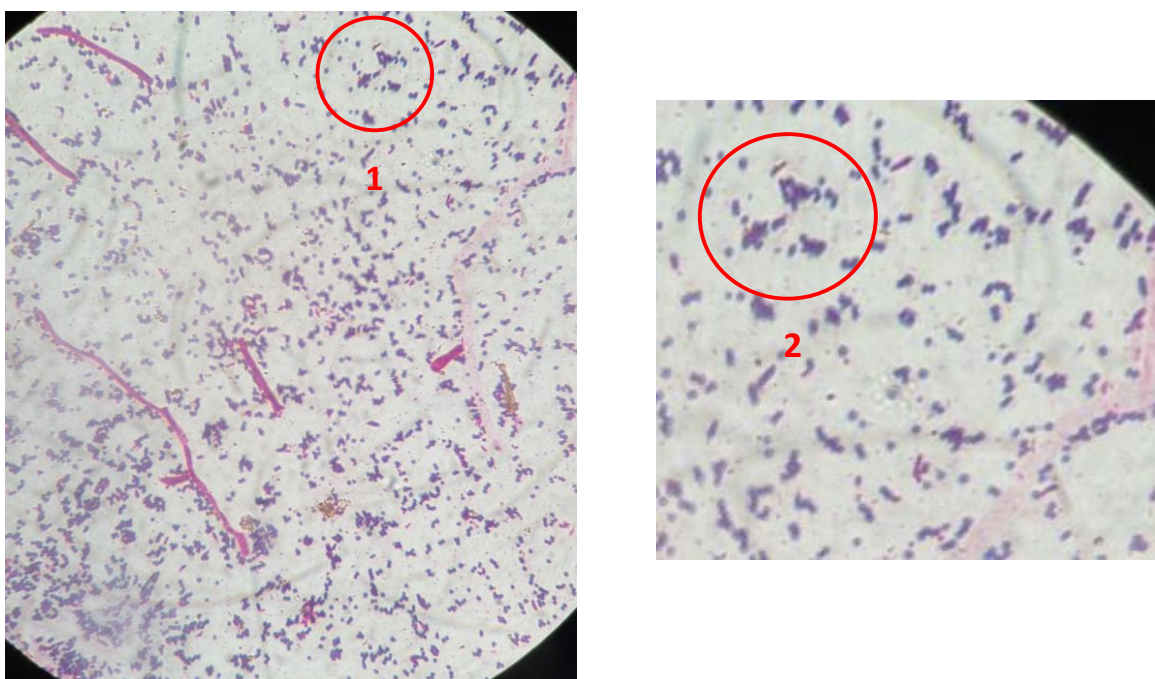
Para identificação das bactérias presentes nas placas de Petri contendo ágar Baird-Parker adicionado de *Egg Yolk* enriquecido com Telurito foi realizado a fixação de uma colônia de bactéria em lâmina para microscópio. Esta lâmina passou pelo processo de coloração de Gram.

Para a realização da coloração deve-se retirar uma colônia de bactérias da placa de Petri com o auxílio de uma alça estéril, realizar o esfregaço na lâmina, fixar no bico de Bunsen. Após ter a lâmina fixada, cobrir com Cristal Violeta (corante) por 1 minuto, sem lavar adicionar o Lugol (corante) e deixar agir por 1 minuto. Ainda sem lavar adicionar Álcool Acetona (descorante) por no máximo 5 segundos, para que a

coloração violeta se desprenda da lâmina. Lavar em seguida. Cobrir a lâmina com Fucsina (corante) por 20 segundos. Por último lavar em água corrente.

Após ter a colônia fixada e corada, observa-la em microscópio. São consideradas *Staphylococcus* spp., bactérias em formato coco (esféricas), agrupadas em cachos e de coloração roxa, que são as Gram positivas. (Figura 4).

Figura 4 – Imagem da colônia de *Staphylococcus* spp. fixada e corada, observada pelo microscópio (aumento de 200 x).



Legenda: 1 e 2 – Colônia de *Staphylococcus* spp., formato cocos, e agrupadas em cachos. A imagem 2 é uma aproximação da imagem 1, ambas no aumento de 200x.

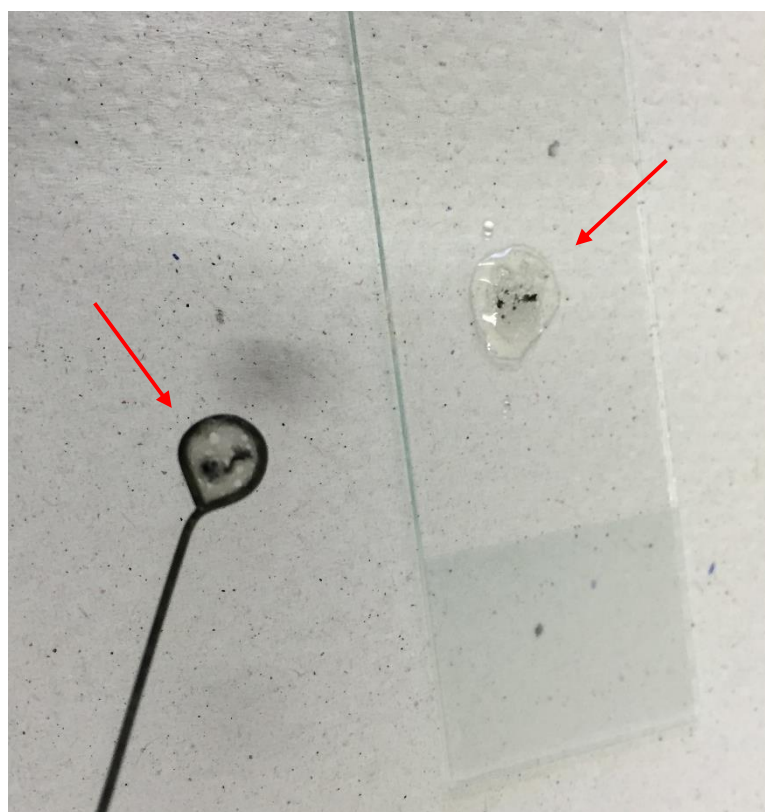
Fonte: Foto tirada pela autora, com autorização dos responsáveis no Laboratório de Alimentos e Saúde Pública da Universidade de Santo Amaro. (2015)

3.4.2.3 Teste da catalase

Este teste é utilizado para diferenciar *Staphylococcus* spp. de *Streptococcus* spp. por serem parecidos morfológicamente. O teste é feito para identificar a enzima catalase. Esta enzima está presente nas bactérias *Staphylococcus* spp., sendo assim, as positivas para o teste são *Staphylococcus* spp e as negativas *Streptococcus* spp..

Em uma lâmina de microscópio coloca-se com o auxílio de uma micropipeta 50µL de peróxido de hidrogênio 3%, com o auxílio de uma alça de platina adiciona-se uma colônia anteriormente cultivada. Ao entrar em contato com o peróxido de hidrogênio as bactérias que contém a enzima catalase produzem bolhas de ar (19). (Figura 5).

Figura 5 – Lâmina e alça de platina contendo peróxido de hidrogênio 3% e colônia de *Staphylococcus* spp. demonstrando resultado positivo para o teste de catalase.



Legenda: As setas indicam as colônias produzindo gás no peróxido de hidrogênio 3%, resultado positivo para o teste realizado.

Fonte: Foto tirada pela autora, com autorização dos responsáveis no Laboratório de Alimentos e Saúde Pública da Universidade de Santo Amaro. (2015)

4. RESULTADOS

Foram analisadas 84 amostras, sendo elas provindas de dez estabelecimentos distintos e coletadas em dias diferentes. Um total de 42 amostras para restaurantes não especializados e 42 amostras para restaurantes especializados em culinária japonesa.

Para pesquisa de coliformes termotolerantes, 32 (76,20%) amostras dos restaurantes especializados apresentaram resultado dentro do limite aceito pela legislação vigente, porém, apenas 9 (21,42%) amostras analisadas tiveram valor dentro do limite aceito para *Staphylococcus* coagulase positiva. As amostras Gram positivas foram 30 (71,42%), amostras Gram positivas e coagulase positivas foram um total de 22 (52,38%) amostras e 40 (95,25%) amostras foram catalase positivas.

Os valores dos restaurantes não especializados, foram 33 (78,58%) amostras apresentaram-se dentro do limite aceito pela legislação vigente para pesquisa de coliformes termotolerantes, enquanto, 13 (30,69%) amostras analisadas estavam dentro do valor aceito para *Staphylococcus* coagulase positiva. As amostras Gram positivas foram 36 (85,70%), amostras Gram positivas e coagulase positivas foram um total de 30 (71,40%) amostras e 39 (92,85%) amostras foram catalase positivas.

Os resultados de coliformes totais e termotolerantes de cada tipo de estabelecimento estão demonstrados na tabela 1.

O resultado do crescimento de *Staphylococcus* spp. de ambos os restaurantes está representado na tabela 2. E após o crescimento da bactéria, a mesma passou por teste de confirmação, em relação a catalase, coagulase e Gram, que estão representados na tabela 3.

Os resultados para cada pesquisa realizada (coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* spp., gram, coagulase, catalase) estão representados no Gráfico 1, de forma comparativa, entre restaurantes especializados e não especializados.

Tabela 1 - População de coliformes totais e termotolerantes (NMP/g) em amostras de sashimi de salmão, colhidas de restaurantes especializados e não especializados em culinária japonesa, da região sul da cidade de São Paulo, SP.

Amostras	Especializados		Não especializados		
	coliformes totais	coliformes termotolerantes		coliformes totais	coliformes termotolerantes
1	2,4x10 ²	0	43	4,3x10	0
2	>1,1x10 ³	0	44	1,5x10	0
3	9,3x10	0	45	6,4x10	0
4	2,8x10	0	46	1,1x10 ³	1,5x10 ²
5	1,1x10 ³	3,6	47	7,5x10	2,0x10
6	>1,1x10 ⁴	3,0	48	4,6x10 ²	7,5x10
7	>1,1x10 ⁴	2,0x10	49	1,5x10 ²	1,5x10 ²
8	>1,1x10 ³	3,6	50	7,5x10	3,9x10
9	>1,1x10 ⁴	3	51	4,6x10 ²	4,3x10
10	2,0x10	0	52	4,3x10	4,3x10
11	4,6x10 ²	0	53	1,1x10 ³	0
12	7,5x10	0	54	1,1x10 ³	0
13	9,1	0	55	>1,1x10 ³	0
14	9,1	0	56	>1,1x10 ⁴	0
15	1,5x10 ²	2,3x10	57	>1,1x10 ⁴	0
16	9,3x10	9,1	58	1,5x10	0
17	7,5x10	3,6	59	4,3x10	0
18	7,5x10	9,1	60	9,1	0
19	1,2x10 ²	0	61	9,1	0
20	1,5x10 ²	1,5x10	62	3,9x10	0
21	2,1x10 ²	7,5x10	63	>1,1x10 ⁴	0
22	2,1x10 ²	2,0x10	64	1,1x10 ³	0
23	1,1x10 ³	1,4x10	65	>1,1x10 ³	0
24	1,5x10 ²	9,1	66	1,1x10 ³	0
25	9,3x10	4,3x10	67	1,1x10 ³	0
26	2,3x10	2,3x10	68	>1,1x10 ⁴	2,9x10 ²
27	2,4x10 ²	1,6x10	69	>1,1x10 ⁴	3,6x10
28	9,3x10	2,1x10	70	>1,1x10 ⁴	2,0x10
29	1,1x10 ³	2,4x10 ²	71	>1,1x10 ⁴	3,9x10
30	2,4x10 ²	2,4x10 ²	72	>1,1x10 ⁴	5,3x10
31	4,6x10 ²	4,6x10 ²	73	>1,1x10 ⁴	2,0x10
32	2,1x10 ²	2,1x10 ²	74	>1,1x10 ⁴	5,3x10
33	>1,1x10 ³	>1,1x10 ³	75	>1,1x10 ⁴	2,0x10
34	2,3x10	2,3x10	76	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ⁴
35	1,2x10 ²	2,0x10	77	>1,1x10 ⁴	>1,1x10 ³
36	1,1x10 ³	4,6x10 ³	78	1,1x10 ³	1,1x10 ³
37	1,6x10 ²	1,6x10 ²	79	1,5x10 ²	4,6x10 ²
38	5,3x10	4,4x10 ²	80	2,4x10 ²	2,4x10 ²
39	1,1x10 ³	1,1x10 ³	81	1,1x10 ³	1,1x10 ³
40	1,1x10 ³	1,1x10 ³	82	1,1x10 ³	7,5x10
41	1,1x10 ³	9,3x10	83	1,1x10 ³	6,4x10
42	1,2x10 ²	7,5x10	84	9,3x10	9,3x10

Fonte: Elaborada pela autora (2016)

Tabela 2 - População de *Staphylococcus* spp. das amostras de sashimi de salmão, colhidas em estabelecimentos especializados e não especializados em culinária japonesa.

Amostras	<i>Staphylococcus</i> spp		
	Especializados	Não especializados	
1	2,5x10 ⁵	43	9,2x10 ³
2	3,2x10 ⁵	44	>2,5x10 ⁴
3	2,7x10 ⁴	45	1,3x10 ⁵
4	3,9x10 ⁴	46	>2,5x10 ⁷
5	4,4x10 ⁴	47	9,0x10 ⁴
6	6,1x10 ⁴	48	1,1x10 ⁶
7	8,3x10 ⁴	49	4,9x10 ³
8	2,1x10 ⁵	50	2,0x10 ³
9	2,5x10 ⁶	51	6,0x10 ⁵
10	9,3x10 ⁴	52	8,0x10 ⁵
11	6,8x10 ⁴	53	4,0x10 ³
12	5,3x10 ⁴	54	2,6x10 ³
13	1,2x10 ⁴	55	2,3x10 ³
14	1,1x10 ⁴	56	2,4x10 ⁶
15	1,6x10 ⁴	57	2,5x10 ⁵
16	4,2x10 ⁴	58	5,0x10 ²
17	4,0x10 ⁵	59	2,7x10 ³
18	1,1x10 ⁵	60	6,0x10 ²
19	5,8x10 ⁴	61	4,0x10 ²
20	4,4x10 ⁵	62	1,8x10 ⁵
21	3,5x10 ⁵	63	1,2x10 ³
22	2,1x10 ⁵	64	4,0x10 ²
23	3,9x10 ⁵	65	8,0x10 ²
24	1,5x10 ⁵	66	5,2x10 ³
25	1,1x10 ⁵	67	2,0x10 ³
26	1,9x10 ³	68	9,7x10 ⁵
27	1,4x10 ⁴	69	5,4x10 ⁵
28	5,1x10 ⁴	70	1,2x10 ⁶
29	8,5x10 ⁴	71	7,7x10 ⁵
30	7,4x10 ⁴	72	3,4x10 ⁵
31	4,7x10 ⁴	73	5,9x10 ⁴
32	5,3x10 ³	74	6,0x10 ⁴
33	3,7x10 ³	75	1,4x10 ⁴
34	1,9x10 ³	76	1,3x10 ⁴
35	9,7x10 ³	77	2,7x10 ⁴
36	3,7x10 ³	78	8,0x10 ⁴
37	2,0x10 ³	79	4,3x10 ⁴
38	1,4x10 ³	80	1,6x10 ⁴
39	7,1x10 ³	81	4,0x10 ⁴
40	2,5x10 ³	82	7,4x10 ⁴
41	3,2x10 ³	83	4,6x10 ⁵
42	1,7x10 ³	84	6,0x10 ⁴

Fonte: Elaborada pela autora (2016).

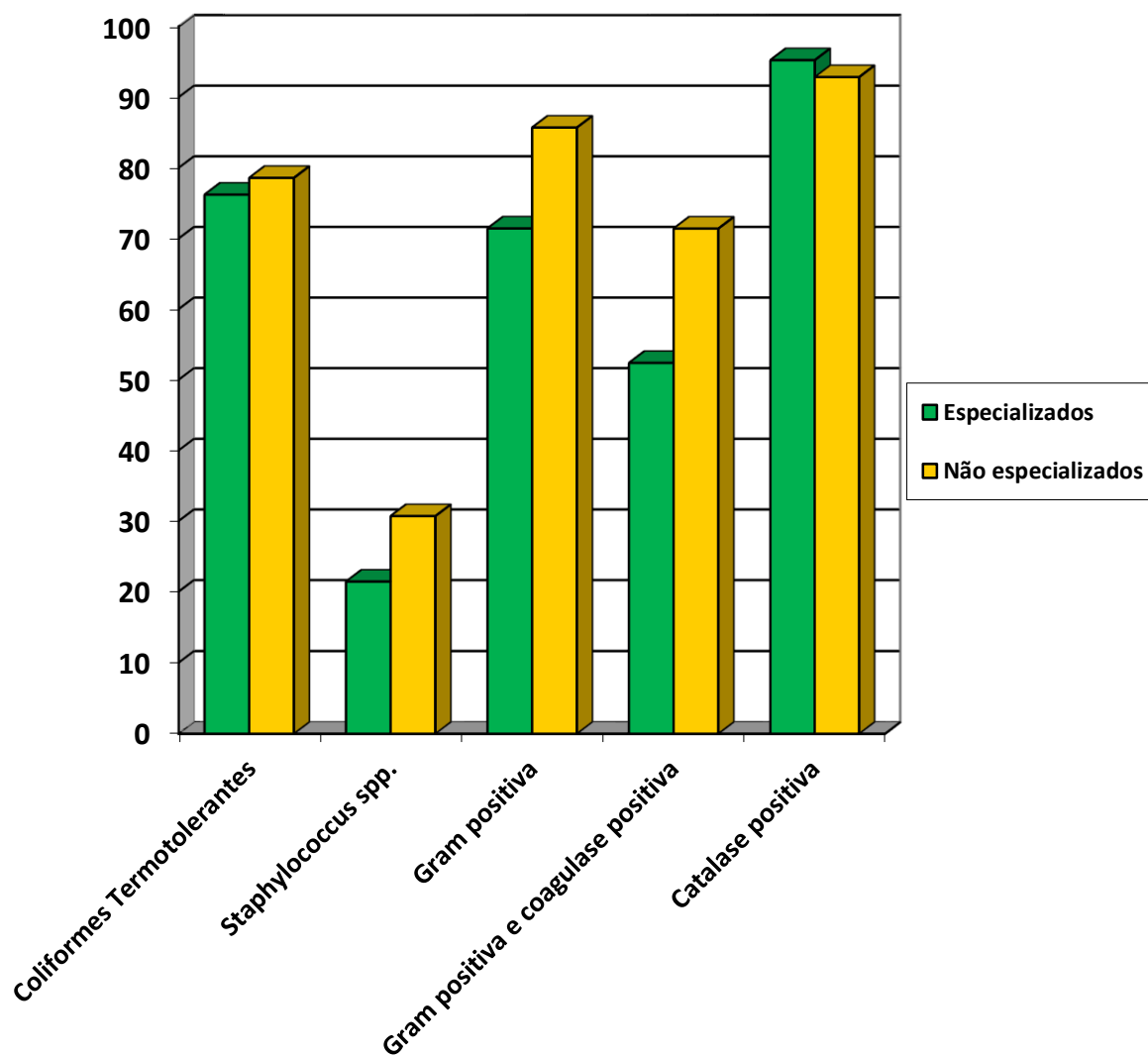
Tabela 3 - Testes confirmatórios, realizados nas populações de *Staphylococcus* spp. encontradas em amostras de sashimi de salmão, colhidas em restaurantes especializados e não especializados em culinária japonesa.

Amostras	Especializados			Amostras	Não especializados		
	Coagulase	Catalase	Gram		Coagulase	Catalase	Gram
1	-	+	+	43	+	+	+
2	+	+	+	44	+	-	+
3	+	+	+	45	+	+	+
4	+	+	+	46	+	+	+
5	+	+	+	47	+	+	+
6	-	+	+	48	+	+	+
7	+	+	+	49	-	+	+
8	+	+	+	50	+	+	+
9	-	-	-	51	-	+	+
10	+	+	+	52	+	+	+
11	+	+	+	53	-	+	+
12	+	+	+	54	+	+	+
13	+	+	+	55	-	+	+
14	+	+	+	56	-	+	+
15	+	+	+	57	+	+	+
16	+	+	+	58	+	+	+
17	-	+	+	59	+	+	+
18	-	+	+	60	+	+	+
19	+	+	+	61	+	+	-
20	-	+	+	62	+	-	-
21	+	+	+	63	+	+	+
22	+	+	+	64	+	+	+
23	-	+	-	65	+	+	+
24	-	+	+	66	+	+	+
25	+	+	+	67	+	+	+
26	+	+	+	68	+	+	+
27	-	+	+	69	+	+	+
28	-	+	+	70	-	+	-
29	+	+	+	71	+	+	+
30	+	+	+	72	-	+	-
31	+	-	+	73	+	+	+
32	-	+	-	74	+	+	+
33	-	+	-	75	+	+	+
34	-	+	-	76	-	+	-
35	-	+	-	77	+	+	+
36	+	+	-	78	-	+	+
37	+	+	-	79	+	+	+
38	+	+	-	80	+	+	-
39	+	+	-	81	+	-	+
40	+	+	+	82	+	+	+
41	+	+	-	83	+	+	+
42	+	+	-	84	+	+	+

Fonte: Elaborada pela autora (2016).

Gráfico 1- Comparativo dos resultados obtidos nas análises

Resultados



Fonte: Elaborado pela autora (2016).

5. DISCUSSÃO

Nesse trabalho encontrou-se valores acima do permitido pela legislação vigente para pesquisa de coliformes termotolerantes em restaurantes especializados e não especializados em 23,80% e 21,42% das amostras, respectivamente. Porém, Sato (20) ao analisar *sushis* de estabelecimentos na cidade de São Paulo encontrou como resultado 33,3% de amostras acima do limite aceito, enquanto, Martins (21) que também pesquisou *sushis* na cidade de São Paulo encontrou 50% das amostras fora do limite da legislação.

Os resultados podem se apresentar diferentes por se referirem a quantidades distintas de amostras, Sato obteve resultados em 20 amostras, Martins em 30 e o presente trabalho obteve os resultados em 42 amostras, se visto no total de 84 amostras de *sashimi* encontra-se 22,61%. Com isso as porcentagens tem maior ou menor variação, de acordo com a quantidade de amostras utilizadas.

Apesar das diferentes porcentagens dos resultados encontrados, todos os trabalhos citados apresentam contaminação por coliformes termotolerantes, caracterizando assim a falha higiênico-sanitária e contaminação do alimento.

Em relação a contaminação por *Staphylococcus* spp., os restaurantes especializados apresentaram 78,58% e os não especializados 69,04% das amostras acima do valor aceito pela legislação vigente. Enquanto Nespolo (22), obteve um resultado de apenas 9,68% das suas amostras fora do limite e Sato (20), obteve 13,3% das suas amostras.

Os resultados encontrados são distintos, devido a quantidade de amostras analisadas, Nespolo e Sato analisaram um total de 30 amostras enquanto esse trabalho analisou 42 amostras por estabelecimento, ou 84 amostras obtendo 73,81%.

Essa diferença nos resultados foi capaz de demonstrar também que a contaminação por *Staphylococcus* spp., é sensível, tornando sua multiplicação variável. E está diretamente relacionada com a higiene inadequada do manipulador e/ou com contaminação cruzada.

Esse trabalho foi capaz de demonstrar a contaminação existente em alimentos consumidos crus, e a grande influência no manuseio dos alimentos. Também mostrou

que os diferentes tipos de restaurantes podem apresentar resultados distintos, porém em alguns fatores analisados obteve-se resultados próximos entre a contaminação dos restaurantes especializados em culinária japonesa e restaurantes não especializados que oferecem o alimento em sistema de *buffet*.

Algumas amostras apresentaram bactérias que ao passarem pela coloração Gram, permaneceram rosas, sendo consideradas bactérias Gram negativas, estas apresentaram formato bastonetes. Ao pesquisar quais bactérias bastonetes e Gram negativas são comuns em *sashimis* e que poderiam proliferar em meio agár Baird Parker adicionado Egg Yolk enriquecido com Telutiro, encontrou-se a bactéria, *Proteus mirabilis*.

Proteus mirabilis é uma enterobactéria com motilidade e capaz de produzir grandes quantidades de urease, é responsável por 90% das as infecções em humanos pelas bactérias do gênero *Proteus*. Encontra-se amplamente distribuída no meio ambiente, na matéria orgânica, no solo e na água. Pode fazer parte da microbiota normal de intestino.

Além de bactérias Gram negativas patogênicas, também existe o problema das bactérias *Staphylococcus coagulase negativa*. As bactérias coagulase negativa não constam na legislação vigente. A legislação refere-se apenas a coagulase positiva. Por sua vez a coagulase negativa, também apresenta potencial patogênico. Nesse estudo das 84 amostras, 22 (26,88%) são coagulase negativa.

Dados da literatura demonstram que algumas espécies de coagulase negativa também produzem enterorotoxinas. As enterotoxinas que são responsáveis pelas intoxicações gerada pela ingestão de alimentos contaminados (23). Por tanto a legislação também deveria ter um limite aceito para bactérias coagulase negativas.

6. CONCLUSÃO

Analisando-se os resultados encontrados, observa-se que a contaminação de *Staphylococcus coagulase* positiva em alimentos (*sashimis*) consumidos cru é muito alta, das amostras analisadas 78,58% em restaurantes especializados e 69,04% em não especializados estão acima do padrão aceito pela legislação vigente. Em contrapartida a contaminação por coliformes termotolerantes é menor, sendo das amostras 23,80% em restaurantes especializados e 21,42% em restaurantes não especializados, acima do limite aceito pela legislação vigente.

Em relação aos tipos diferente de restaurantes há uma pequena variação nos resultados da análise de contaminação. Isso demonstra que a maior parte da contaminação é devido ao erro na manipulação, a forma a se apresentar o alimento (*buffet* ou servido de acordo com a solicitação do cliente), não tem grande interferência na proliferação bacteriana.

Doenças transmitidas pelo alimento são comuns, já que muitas vezes não tem o tratamento adequado, como refrigeração ou cocção por tempo e temperatura adequada, não havendo a eliminação de microorganismos patogênicos.

A contaminação é grande por ser alimento cru, que é extremamente manuseado e não sofre nenhum tipo de tratamento térmico ou químico após este manuseio, logo toda a contaminação transmitida ao alimento é consumida de imediato.

Por isso deve-se fazer um trabalho de conscientização da população sobre os riscos da contaminação alimentar, e principalmente a conscientização dos manipuladores dos alimentos crus.

REFERÊNCIAS

- (1) BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Pescados e Derivados, C.7, seção 1. Brasília,1952.
- (2) EMBRAPA. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: < http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fid5gmye02wyiv80z4s473lakm7pt.html > Acesso em 02 jun 2016.
- (3) GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Higiene e vigilância Sanitária de alimentos. 3ª ed. São Paulo: editora Varela; 2008.
- (4) VIEIRA, R.H.S.F. et al., *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva em *sushi* e *sashimis* preparados em dois restaurantes da cidade de Fortaleza, Ceará. Boletim Técnico Científico – CEPENE, Tamandaré, v.15, n.1, p. 9-14, 2007.
- (5) SATO, N.H. et al., Quality assurance of raw fish based on HACCP concept, Food control. v.16, p.301-307, 2005.
- (6) PAIVA, C.P.; POSSAS, C.A.; PANETTA, J.C. Frequência de quadros gastroentéricos em astronautas: pressuposta ligação com toxienfecções alimentares. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v.14, n.75, p.13-23, 2000.
- (7) SILVA JR., E.A. Manual de controle higiênico Sanitário em alimentos. 4ª ed. São Paulo: editora Varela; 2002.
- (8) GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Higiene e vigilância Sanitária de alimentos. 2ª ed. São Paulo: editora Varela; 2003.
- (9) FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu; 2003.

(10) Basti, A,A; MISAGHI, A;SALEHI,T,Z;KAMKAR,A. Bacterial pathogens in fresh, smoke and salted Iranian fish. Food Control, 2006; 17: p.183-188. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/journal> >. Acesso em : 20 abril 2016

(11) ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 10 jan 2001; seção 1:45-53

(12) BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 10 jan 2001.

(13) OPAS/INPPAZ. HACCP: Instrumentos essenciais para a inocuidade alimentar, Buenos Aires, OPAS/INPPAZ, 2001.

(14) BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997. Aprova o regulamento Técnico de identidade e qualidade de peixe fresco (inteiro e eviscerado). Diário Oficial da União. 19 maio 1997; Seção 1:10282.

(15) TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A. Microbiologia. 3ª ed. São Paulo: Atheneu 1999. p.14-17

(16) TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 5ª ed. São Paulo: Atheneu 2008. p.7-8

(17) APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Compedium of Methods for the Microbiological Examination Food. 4ª Ed.,Washington, 2001.

(18) SILVA, N, DA; JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. 2ª ed. São Paulo (SP): Varela; 2001.

(19) ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Ministério da Saúde. Módulo 4, Gram-positivas. Disponível em : < http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/id_stre2.htm >. Acesso em: 20 abril 2016.

(20) SATO, R.A. Características microbiológicas de *sushis* adquiridos em estabelecimentos que comercializam comida japonesa. 2013. 55 f. dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de ciências agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, 2013.

(21) 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. 2006. 142 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

(22) NESPOLO, N. M. Características microbiológicas de salmão (*Salmo salar*) comercializado em algumas cidades da região nordeste do estado de São Paulo. 2009. 77 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de ciências agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, 2009.

(23) PAIVA, C.P.; POSSAS, C.A.; PANETTA, J.C. Estafilococos coagulase negativa: potenciais patógenos em alimentos. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, n.129, p.32-33, 2005.