



## ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE SASHIMIS A BASE DE SALMÃO, COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE MARINGÁ-PR QUANTO A PRESENÇA DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES.

*Fernanda Braghini<sup>1</sup>, Eduardo Gauze Alexandrino<sup>2</sup>, Fernanda Paini Leite<sup>3</sup>, Ernesto Guilherme Kimmelmeier<sup>4</sup>, José Eduardo Gonçalves<sup>5</sup>*

**RESUMO:** O consumo de pescados, principalmente “in natura” aumentou nos últimos anos e sabe-se que a qualidade do peixe fresco pode ser influenciada pelos hábitos de higiene dos manipuladores de alimentos e de seu ambiente de trabalho, logo, este trabalho objetivou-se em analisar a qualidade microbiológica do sashimi a base de salmão comercializado nos restaurantes de Maringá-PR, quanto à presença de Coliformes Totais e Termotolerantes, pois o alimento não passa por nenhum tipo de tratamento ou processamento antes do consumo, favorecendo o crescimento de micro-organismos potencialmente patogênicos, podendo desencadear o desenvolvimento de gastroenterites. Para isso, realizou-se uma análise microbiológica quantitativa de filés de *sashimi*, totalizando 15 amostras de cinco restaurantes (R1, R2, R3, R4 e R5), coletando 3 amostras por restaurante em períodos diferentes, totalizando 15 amostras. Estas foram acondicionadas de maneira estéril e transportadas em caixas isotérmicas com baterias de gelo até o laboratório. Para a análise as amostras foram previamente preparadas em diluições 1:1000 e incubadas em tubos contendo caldo Lauril-Triptose. Posteriormente efetuou-se prova confirmatória, os tubos que apresentaram produção de gás foram repicados em tubos contendo caldo Verde Brilhante (VB) e caldo *Escherichia coli* (EC). Comparou-se os resultados com a Tabela Número Mais Provável e os limites estabelecidos pela RDC nº 12/01. Os resultados demonstraram que 53,33% das amostras obtiveram positividade para *Coliformes Termotolerantes*. Quanto à presença de *Coliformes Totais*, 100% da amostra apresentaram-se positivas, porém a Legislação não estabelece limites para pescado fresco ou refrigerado. Quando comparado os restaurantes, observou-se que R1 e R4 foram os que apresentaram um menor grau de contaminação por Coliformes Termotolerantes, quando comparados com os R2, R3 e R5. Por fim, apesar dos resultados positivos, todas as amostras apresentaram conformidade com os limites estabelecidos pela RDC nº 12/01 da ANVISA. Apesar dos valores encontrados estarem dentro do intervalo considerado aceitável pela ANVISA, a determinação da presença ou ausência dos micro-organismos analisados é de extrema importância, pois tais dados refletem diretamente as condições higiênicas e sanitárias dos manipuladores de alimentos e de seu ambiente de trabalho.

**PALAVRAS-CHAVE:** Coliformes Termotolerantes; Gastroenterites; Manipuladores de alimentos; Sashimi.

### 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, observou-se um aumento significativo no consumo de pescados, impulsionado pela consciência e hábitos dos consumidores em procurar alimentos mais saudáveis, visando uma melhor qualidade de vida. Esta demanda de pescados gerou uma grande oferta destes alimentos em estabelecimentos especializados. O hábito de ingerir pescados “in natura” é de introdução recente nos restaurantes brasileiros, com destaque para o *sashimi* de salmão, um exemplo da culinária tipicamente japonesa (VALLANDRO, 2010).

De modo geral, a qualidade do peixe fresco, bem como o desenvolvimento e disseminação de micro-organismos contaminantes podem ser influenciados por diversos fatores, entre eles: acondicionamento e transporte do peixe, atividade de água, habitat do pescado, hábitos de higiene dos manipuladores de alimentos, tempo de exposição em prateleiras e a ação de enzimas e sucos digestivos (PEREDA *et. al.*, 2005), portanto o

<sup>1</sup> Biomédica, mestranda do programa de pós-graduação em Promoção da Saúde do Centro Universitário de Maringá – UniCESUMAR, Maringá/PR, bolsista Taxa/CAPES. [fernanda.braghini@hotmail.com](mailto:fernanda.braghini@hotmail.com)

<sup>2</sup> Educador Físico, mestrando do Programa de pós-graduação em Promoção da Saúde do Centro Universitário de Maringá – UniCESUMAR/PR. Bolsista Taxa/CAPES. [eduardogauze@hotmail.com](mailto:eduardogauze@hotmail.com);

<sup>3</sup> Biomédica, mestranda do programa de pós-graduação em Promoção da Saúde do Centro Universitário de Maringá - UniCESUMAR, Maringá/PR, bolsista Taxa/CAPES. [nanda\\_tga@hotmail.com](mailto:nanda_tga@hotmail.com);

<sup>4</sup> Farmacêutico docente do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá - UniCESUMAR, Maringá/PR. [ernesto\\_k@uol.com.br](mailto:ernesto_k@uol.com.br);

<sup>5</sup> Professor, Doutor do programa de pós-graduação em Promoção da Saúde do Centro Universitário Cesumar - UniCESUMAR, Maringá/PR. [jose.goncalves@unicesumar.edu.br](mailto:jose.goncalves@unicesumar.edu.br).



pescado destinado a este fim deve ser fresco e conservado sob refrigeração, com o propósito de controlar o desenvolvimento microbiológico (MOURA FILHO *et. al.*, 2007).

Vallandro (2010) ressalta que o consumo de *sashimi* pode ser considerado de alto risco à saúde e ao desenvolvimento de problemas gastrointestinais, pois o mesmo é um alimento bastante manipulado e não passa por nenhum tipo de tratamento térmico capaz de diminuir ou eliminar possíveis micro-organismos patogênicos ali presentes.

Segundo Pelczar Jr. *et al.* (2005), a gastroenterite é um processo patológico de origem principalmente bacteriana, localizado na mucosa do trato gastrointestinal. Para que ocorra esta infecção, o alimento ingerido deve conter quantidades suficientes de patógenos que causem evasão das defesas do organismo, tendo como resultado a multiplicação de micro-organismos e produção de toxinas capazes de provocar distúrbios intestinais. Esta infecção associada a alimentos é reconhecida mundialmente, sendo muito correlacionada a manipuladores de alimentos de nível educacional relativamente baixo. (Almeida *et. al.*, 1995).

É evidente, pois, a importância de pesquisar a presença de micro-organismos em pratos preparados de filés de *sashimi*, pois os mesmos podem transmitir micro-organismos patogênicos, os quais quando em alta quantidade e associados à produção de toxinas, podem desencadear problemas gastrointestinais. Logo, esta pesquisa teve como objetivo a análise bacteriológica de sashimis a base de salmão, comercializados na cidade de Maringá-PR, quanto à incidência de Coliformes Totais e Coliformes Termotolerantes.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se análise microbiológica quantitativa de pratos preparados para viagem, com aproximadamente 200g de filés de *sashimi* de salmão. Estes foram adquiridos anonimamente em cinco restaurantes da cidade de Maringá-PR, entre maio e agosto, coletando 3 amostras por restaurante, totalizando 15 amostras. As amostras foram acondicionadas separadamente em sacos estéreis e caixas isotérmicas contendo baterias de gelo.

As culturas para Coliformes totais e Coliformes termotolerantes foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do UniCESUMAR, num período máximo de 03 horas a partir do momento da coleta.

Inicialmente realizou-se a preparação das amostras para as análises, de maneira estéril em câmara de fluxo laminar, na qual, primeiramente foi realizada a desinfecção da superfície externa dos sacos contendo as amostras, com álcool 70%, antes da sua abertura. Com o auxílio de bisturi, espátulas de madeira e placas de Petri estéreis, os 200g de *sashimi* foram retirados e cortados em pequenos fragmentos, formando um *pool* da amostra. A partir disto, foram separadas porções de 25g de cada amostra. Essas porções de cada restaurante, foram inoculadas em frascos de erlenmeyer contendo 225mL de solução água peptonada 1% estéril, formando a diluição  $10^{-1}$ . A partir da diluição inicial, realizaram-se as diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  respectivamente em tubos de ensaio.

As pesquisas de Coliformes totais e Coliformes termotolerantes, foram realizadas de acordo com a metodologia do Número Mais Provável (NMP). Foram pipetadas alíquotas de 1 mL de cada diluição não incubada ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) e inoculadas em 3 tubos para cada diluição contendo lauril-Triptose, totalizando 9 tubos para todas diluições, que foram incubados a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 a 48 horas.

Posteriormente efetuou-se a prova confirmatória, onde os tubos que apresentaram fermentação (produção de gás) no caldo lauril-Triptose foram repicados com auxílio de alça bacteriológica para uma série de 9 tubos com a sua respectiva diluição identificada em caldo verde brilhante (VB) e caldo *Escherichia coli* (EC). Os caldos foram incubados a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24-48 horas e  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24-48 horas, respectivamente.

Após a incubação e feita a contagem de tubos positivos (com produção de gás), comparou-se os resultados com a Tabela e NMPe os limites estabelecidos pela ANVISA na portaria n° 12, de 1 de janeiro de 2001 (102/g de alimento).

Os dados obtidos foram tabulados em planilhas eletrônica e posteriormente analisados através de estatística descritiva e teste exato de Fisher para verificação de associação através do *software Statistica 8.1*. O nível de significância estatística adotado foi de 5%.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Dos resultados obtidos das 15 amostras coletadas no período de maio a agosto, oito (53,33%) das amostras apresentaram-se positivas e seis (46,67%) das amostras apresentaram-se negativas para Coliformes Termotolerantes à  $45^\circ\text{C}$ , variando de 0,1 a  $>4,7$  NMP/g, porém não demonstraram valores acima do permitido ( $<102$  NMP/g) pela ANVISA (portaria n° 12 de 1 de Janeiro 2001), como mostra na Tabela 1.



**Tabela 1-** Grau de positividade e negatividade para *Coliformes Termotolerantes* em cada restaurante analisado, de acordo com as três amostras coletadas em cada estabelecimento.

	Coliformes Termotolerantes												p
	Negativo		Positivo (NMP/g)										
			0,1 - 2,3		0,1 - 3,6		0,4 - 4,7		0,4 - 12		1,0 - 15		
n	%	n	%	N	%	N	%	n	%	n	%		
R1	2	13,3	0	-	0	-	0	-	1	6,7	0	-	0,59682
R2	1	6,7	1	6,7	0	-	0	-	0	-	1	6,7	
R3	1	6,7	1	6,7	0	-	0	-	1	6,7	0	-	
R4	2	13,3	0	-	1	6,7	0	-	0	-	0	-	
R5	1	6,7	1	6,7	0	-	1	6,7	0	-	0	-	

\* Teste Exato de Fisher. Não existe associação em coliformes termotolerantes em restaurantes coletados ( $p > 0,05$ )

**Fonte:** dados da pesquisa.

A presença de Coliformes Termotolerantes pode estar correlacionada com a presença de *Escherichia coli*, sendo considerada pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2006) como a indicadora de contaminação fecal e presença de organismos patogênicos.

Lima *et. al* (2009)., em pesquisa realizada na cidade de Recife, notificaram valores aceitáveis em 80% (16) das amostras de *sashimi* coletadas em restaurantes especializados, sendo consideradas satisfatórias para o consumo. Moura Filho (2007) demonstra que houve variações na presença de *Coliformes Termotolerantes*, porém os resultados não demonstraram valores acima do permitido pela ANVISA. Relata também que pelo menos uma amostra de vegetal de cada restaurante apresentou positividade para o NMP/g de *Coliformes Termotolerantes* acima do permitido.

Oliveira *et al.* (2003) em pesquisa realizada em manipuladores de alimentos, concluíram que as condições higiênico-sanitárias do ambiente, qualidade da água, bem com a maneira de manipulação, influenciam diretamente na qualidade microbiológica do alimento. Moura Filho (2007) demonstra em seu trabalho, que os vegetais possuem um grau de contaminação maior do que o *sashimi* consumido, logo, pode ocorrer contaminação cruzada dos vegetais utilizados para a apresentação do alimento.

A partir do exposto, observa-se que os restaurantes R1 e R4 foram os que apresentaram um menor grau de contaminação, pois pelo menos 2 amostras (correspondem a 13,33% das amostras totais) não apresentaram Coliformes Termotolerantes, quando comparados com os restaurantes R2, R3 e R5.

Quanto a presença de Coliformes Totais, as amostras apresentaram-se positivas, variando de 1,4 - >240 NMP/g, porém a Legislação não estabelece limites para pescado fresco ou refrigerado.

#### 4 CONCLUSÃO

Este trabalho evidenciou a importância da análise microbiológica de alimentos à base de filés crus de *sashimi*, pois esse alimento não passa por nenhum tipo de tratamento e/ou processamento na hora do consumo, favorecendo o crescimento de micro-organismos.

Apesar da variação de contaminação das amostras analisadas, todas apresentaram conformidade com os limites estabelecidos pela RDC nº 12/01 da ANVISA. A determinação da presença ou ausência dos micro-organismos analisados é de extrema importância, pois tais dados refletem diretamente as condições higiênicas e sanitárias dos manipuladores de alimentos e de seu ambiente de trabalho. Ressaltamos que não foi possível avaliar o nível de contaminação de cada restaurante, pois não houve um grau de significância expressivo devido à baixa quantidade de amostras coletadas por restaurante analisado, portanto, o desenvolvimento de novas pesquisas com um número maior de amostras permitiria uma melhor análise da qualidade higiênico-sanitária dos restaurantes.

#### REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. C. C.; KUAYE, A. Y.; SERRANO, A. M.; ALMEIDA, P. F. Avaliação e controle da qualidade microbiológica de mãos de manipuladores de alimentos. rev. Saúde Pública, Salvador, v.29, n.4, p. 290-294, 1995.

BRASIL, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, Secretaria de defesa agropecuária instrução normativa nº 62 de agosto de 2003. Oficializar os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água.



Disponível em: <http://www.hidrolabor.com.br/IN62.pdf> . Acesso em: 12/03/2012.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria MS nº 1469, de 29 de dezembro de 2000. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. D.O.U., Brasília, 2 jan. 2001. Disponível em:  
<[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria\\_1469.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria_1469.pdf).> Acesso em: 07/09/2012.;

LIMA, R.M.T. et al. Avaliação microbiológica de sushi e sashimis comercializados na cidade do Recife-PE. 2009.;

MOURA FILHO, Leonardo G. M. M.; MENDES, Emiko S. 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. Dissertação. 2007. Universidade Federal Rural de Pernambuco.

OLIVEIRA, A. M. et al. Manipuladores de alimentos: um fator de risco. Higiêne Alimentar, Recife, vol. 17, n.114/115, p. 12 – 19, 2003.;

PELCZAR JR, Michael J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, Noel R.; EDWARDS, Diane D.; PELCZAR, Merna F. Microbiologia: conceitos e aplicações. 2 ed., São Paulo: Pearson Makron Books, 2005. p. 222-225. cap.25.

VALLANDRO, Marcelo J. Avaliação da qualidade microbiológica de sashimis a base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa na cidade de Porto Alegre – RS. Dissertação (Mestrado em Bacteriologia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.