UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
MESTRADO EM CIENCIA ANIMAL - MCA

KARINA SILVA CORDEIRO

MICRO-ORGANISMOS INDICADORES E PATOGÊNICOS, SUSCEPTIBILIDADE À ANTIMICROBIANOS E HISTAMINA EM *SASHIMI* DE SALMÃO (*Salmo salar*)

São Luís
2017

KARINA SILVA CORDEIRO

MICRO-ORGANISMOS INDICADORES E PATOGÊNICOS, SUSCEPTIBILIDADE À ANTIMICROBIANOS E HISTAMINA EM *SASHIMI* DE SALMÃO (*Salmo salar*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Francisca Neide Costa
Coorientadora: Prof.ª Dr.ª Isabel Azevedo Carvalho

São Luís
2017

KARINA SILVA CORDEIRO

MICRO-ORGANISMOS INDICADORES E PATOGÊNICOS, SUSCEPTIBILIDADE À ANTIMICROBIANOS E HISTAMINA EM *SASHIMI* DE SALMÃO (*Salmo salar*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em: ____/____/____ pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof.ª Dr.ª Francisca Neide Costa
Orientadora

_____

Prof.ª Dr.ª Isabel Azevedo Carvalho
1º membro

_____

Prof.ª Dr.ª Rejeana Márcia Santos Lima
2º membro

Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois, o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde quer que andar.
(Josué 1.9 b)

Ao Deus Eterno, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo cuidado, proteção, sustento e socorro bem presente.

À orientadora prof.ª Dr.ª Francisca Neide Costa pela credibilidade e oportunidade cedida.

À prof.ª Dr.ª Isabel Azevedo Carvalho pelo auxílio, contribuições e amizade.

A prof.ª Dr.ª Cáritas de Jesus Silva Mendonça pela presteza, disponibilidade e conhecimentos compartilhados.

Aos professores do Mestrado Ciência Animal pelo auxílio e ensinamentos.

Ao prof.º Dr.º Felício Garino, pelas orientações e ambientação no laboratório.

Aos estagiários do Laboratório de Microbiologia e Alimentos que se disponibilizaram e me ajudaram em situações ímpares.

A D. Ruth, Célia, Rose, pela amizade, presença e orientações no laboratório.

A minhas amigas e colegas de mestrado e labuta Daniele Rosa, Lorena Souto, Márcia, Bruno, Giovanni, Eldo, Daniela Sales, Ludmila, Maximiliano e Alessandra. Não poderia esquecer de minha "tia" Fabiana Borralho, muito obrigada.

Aos colegas dos laboratórios de Imunologia e Biologia Molecular que me emprestaram seus conhecimentos, equipamentos, tempo e paciência.

A minha família, que mesmo longe e não entendendo a maioria das coisas que eu falava sobre minha rotina e meus anseios, me incentivou a superar mais esse degrau na vida.

A Helton Pimenta por me ouvir com paciência, incentivar e me dar carinho.

A D. Socorro pela presteza, auxílio e alegria.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo durante o período do mestrado.

A FAPEMA pela concessão do auxílio financeiro à pesquisa por meio do Edital Universal n.º 40/2014.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu estivesse aqui, finalizando esta etapa, superando dia a dia obstáculos, chorando ou sorrindo, aprendendo e amadurecendo e, então, poder proferir meus agradecimentos

CORDEIRO, K.S. **Micro-organismos indicadores e patogênicos, susceptibilidade à antimicrobianos e histamina em *sashimi* de salmão (*Salmo salar*).** [Indicator and pathogenic microorganisms, antimicrobial susceptibility and histamine in salmon sashimi (*Salmo salar*)]. 2017. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2017.

RESUMO

Os brasileiros apreciam peixes, como o salmão proveniente especialmente do Chile, assim como da Argentina e China, principalmente como peixe fresco e congelado. Estudos que estimem a qualidade sanitária de alimentos consumidos crus e de consumo do pescado (salmão), como *sashimi*, são necessários para definir a qualidade de utilização desses produtos, as práticas de consumo e suas possíveis consequências ao estado de saúde da população. As amostras de *sashimi* de salmão (*Salmo salar*) foram coletadas de 10 restaurantes especializados, no município de São Luís – MA, onde em cada restaurante foram coletadas seis amostras, perfazendo um total de 60 amostras. No Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da UEMA, as amostras foram analisadas quanto a: contagem de coliformes a 35ºC e 45ºC, contagem de *Staphylococcus aureus*, identificação de *Escherichia coli* e *Vibrio parahaemolyticus*, isolamento e identificação de *Salmonella* sp., realização de suscetibilidade a antimicrobianos das cepas isoladas e análise da determinação de histamina em todas as amostras. Os resultados foram avaliados estatisticamente utilizando o teste *Skott Knott*. No resultado das análises foram verificadas a ausência de *Vibrio parahaemolyticus* em 100% das amostras testadas; presença de *Salmonella* sp. em 3 (5%) das amostras; coliformes a 35ºC de 0,4 x10 a $\geq$ 2,4 x10^2NMP/g, coliformes a 45ºC variaram de 0 a $\geq$ 2,4 x 10^2 NMP/g com 20% (12) > 10^2 NMP/g, destes foram identificados cepas de *E. coli* em 3 (5%) das amostras; quanto aos *Staphylococcus aureus* apresentaram contagem de <20 a 5,0 x 10^4 UFC/g, e nenhuma das amostras apresentou *S.* coagulase positiva; *Aeromonas* spp. foram identificadas em 95% das amostras, destas 60 (91%) foram identificadas como *A. hydrophila* e 6 (9%) *A. caviae.* Das 66 cepas de *Aeromonas* spp. testadas aos antimicrobianos, apresentaram sensibilidade a CPM (81,82%), GEN (59,09%) e LVX (56,06%) e resistência a AMP e CRX - 96,97% e 92,42%, respectivamente, dentre estas, uma amostra apresentou resistência a todos os antimicrobianos testados. Os isolados de *E. coli* apresentaram 100% de sensibilidade a CPM, CTX, LVX, PPT e SUT; ao passo que apresentaram maior resistência ao antimicrobiano AMP (66,67%). As cepas de *Salmonella sp.* apresentaram 100% de sensibilidade a GEN, AMC, CRX, CPM, CTX, LVX e PPT e 33,33% de resistência a AMP, AMI e SUT. Os limites de concentração de histamina variaram de 44,06 +0,74 a 505,46 +8,83 mg/Kg de sashimi de salmão e 21 dessas amostras apresentaram concentração superior a 100mg/Kg. As amostras analisadas apresentam condições higiênicos sanitárias insatisfatórias e riscos para a saúde pública, além dos micro-organismos isolados terem apresentado elevada resistência aos antimicrobianos testados e elevadas concentrações de histamina, teoricamente capazes de causar sintomas de intoxicação escombróide.

Palavras-chave: pescado, micro-organismos, antimicrobianos, escombrotoxina, saúde.

CORDEIRO, K.S. **Indicator and pathogenic microorganisms, antimicrobial susceptibility and histamine in salmon sashimi (*Salmo salar*).** [Micro-organismos indicadores e patogênicos, susceptibilidade à antimicrobianos e histamina em *sashimi* de salmão **(***Salmo salar***)**]. 2017. 107f. Dissertation (Master of Animal Science) – University of Maranhão, São Luis, 2017.

ABSTRACT

Brazilians appreciate fish, such as salmon from Chile, Argentina and China. Mostly like fresh and frozen fish. Studies that estimate the sanitary quality of raw food consumed and fish consumption (salmon), such as sashimi, are necessary to define the quality of use of these products, consumption practices and their possible consequences to the health status of the population. Samples of salmon *sashimi* (*Salmo salar*) were collected from 10 specialized restaurants in the municipality of. In each restaurant, six samples were collected, making 60 samples, which were sent to the Laboratory of Microbiological Analysis of Food and Water of the UEMA where they were carried out: counting of coliforms at 35 ºC and 45 ºC, *Staphylococcus* count, identification of *Escherichia Coli* and *Vibrio parahaemolyticus*, isolation and identification of *Salmonella* sp. to antimicrobial susceptibility of strains isolated, and analysis of histamine determination in all samples. The results were statistically evaluated using the Skott Knott test. The following results were obtained: absence of *Vibrio parahaemolyticus* in 100% of the samples tested; Presence of Salmonella sp. In 3 (5%) of the samples; of coliforms at 35 °C of 0.4 x 10 to $\geq$ 2.4 x 10^2 NMP/g, coliforms at 45 °C ranged from 0 to > 2.4 x 10^2 NMP/g with 20% (12)> 10^2 UFC/g, of these identified strains of *E. coli* in 3 (5%) of the samples; For *Staphylococcus* showed a count of <20 to 5.0 x 10^4 CFU / g, and none of the samples had *S.* coagulase positive; *Aeromonas* spp. Were identified in 95% of the samples, of which 60 (91%) were identified as *A. hydrophila* and 6 (9%) *A. caviae*. Of the 66 strains of *Aeromonas* spp. (81.82%), GEN (59.09%) and LVX (56.06%) and resistance to AMP and CRX - 96.97% and 92.42%, respectively. These samples showed resistance to all tested antimicrobials. The isolates of *E. coli* presented 100% sensitivity to CPM, CTX, LVX, PPT and SUT; where as they presented greater resistance to the antimicrobial AMP (66.67%). The strains of *Salmonella* sp. Presented 100% sensitivity to GEN, AMC, CRX, CPM, CTX, LVX and PPT and 33.33% of resistance to AMP, AMI and SUT. The concentration limits of histamine varied from 44.06 +0.74 to 505.46 +8.83 mg / kg of salmon sashimi and 21 of these samples had a concentration higher than 100mg / kg. The analyzed samples present unsatisfactory sanitary conditions and public health risks, besides the isolated microorganisms presented high resistance to the tested antimicrobials and high concentrations of histamine, theoretically capable of causing symptoms of escombroid poisoning.
Key words: fish, microorganisms, antimicrobials, scombrotoxin, health.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1: Mapa dos locais de coleta de amostras no município de São Luís– MA 29

Capítulo III

Figura 1: Resultado do teste de sensibilidade de cepas de *Escherichia coli* frente aos antimicrobianos estudados 68

Figura 2: Resultado do teste de sensibilidade de cepas de *Salmonella* sp. frente aos antimicrobianos estudados 69

Figura 3: Resultado do teste de sensibilidade de cepas de *Aeromonas* sp. frente aos antimicrobianos estudados 69

Capitulo IV

Figura B.1: Curva Analítica da solução padrão de histamina 1g/L em solução HCL 0,1mol/L 85

Figura B.2: Cromatograma de extrato de amostra de peixe com identificação de histamina. 85

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1- Gradiente de eluição para análise de histamina 35

Capitulo II

Tabela 1- Determinação do Número Mais Provável (NMP/g) de coliformes a 35ºC em amostras de *sashimi* de salmão em dez restaurantes de São Luís - MA, 2017 60

Tabela 2- Determinação do Número Mais Provável (NMP/g) de coliformes a 45ºC em amostras de *sashimi* de salmão em dez restaurantes de São Luís - MA, 2017 61

Tabela 3- Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *Staphylococcus* coagulase negativa em amostras de *sashimi* de salmão de dez restaurantes de São Luís - MA, 2017 61

Tabela 4 - Espécies de bactérias do gênero *Aeromonas* isoladas de amostras de sashimi de restaurantes na cidade de São Luís, 2017 62

Capitulo III

Tabela 1- Índice de Múltipla Resistência aos Antimicrobianos (MAR) de *Aeromonas* sp., *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. provenientes de s*ashimi* de salmão, 2017 70

Capitulo IV

Tabela A.1- Gradiente de eluição para análise de histamina 83

Tabela B.1- Determinação do Número Mais Provável (NMP/g) de coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Salmonella* sp. em amostras de *sashimi* de salmão em dez restaurantes de São Luís - MA, 2017 85

Tabela B.2- Níveis de histamina em amostras de sashimi de salmão (*Salmo* salar) de dez restaurantes de São luís – MA, 2017 86

Tabela B.3- Coeficientes de variação (CV), segundo determinação de histamina das amostras de *sashimi* de salmão de dez restaurantes de São Luís - MA, 2017 86

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

AIEC	*Escherichia coli* Aderente Invasiva
ALICEWEB	Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHA	American Public Health Association
APHA	American Public Health Association
BPP	Boas Práticas de Produção
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CV	Coeficiente de Variabilidade
CVS	Centro de Vigilância Sanitária
DAEC	*Escherichia coli* de Aderência Difusa as Células Epiteliais
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EAEC	*Escherichia coli* Enteroagregativa
EHEC	*Escherichia coli* Entero-hemorrágica
EPEC	*Escherichia coli* Enteropatogênica clássica
ETEC	*Escherichia coli* Enterotoxigênica
FAO	Food and Agriculture Organization
FAPEMA	Fundação e Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão
FDA	Food and Drug Administration
FDA	Goof and Drug Administration
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Point
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSTM	Histamina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INViC	Indol, Vermelho de metila, *Voges-Proskauer* e Citrato
INViC	Indol, Vermelho de metila, *Voges-Proskauer* e Citrato
LOD	Límite de Detecção
LOQ	Límite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
mL	Mililitro
NMP	Número Mais Provável
OMS	Organização Mundial de Saúde
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
PTFE	Politetrafluoretileno
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
sp.	Espécie
spp.	Subespécie
SS	*Sashimi* de salmão
STEC	*Escherichia coli* Produtora de Shiga
TCA	Ácido Tricloroacético
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USD	United States Dollar
USFDA	Food and Drug Administration the States United
ω	Ômega

SUMÁRIO

CAPÍTULO I **12**
1 INTRODUÇÃO **13**
2. OBJETIVOS **16**
2.1 Geral 16
2.2 Específicos 16
3 REVISÃO DE LITERATURA **17**
3.1 Panorama econômico associado a produção e consumo de pescado 17
3.2 Fatores históricos sobre o consumo de peixe cru 18
3.3 Atual proveito no consumo de peixe cru no Brasil 19
3.4 Deterioração do Pescado 20
3.5 Perigos microbiológicos no pescado cru 22
3.6 Suscetibilidade *in vitro* aos antimicrobianos 26
4 MATERIAIS E MÉTODOS **28**
4.1 Área de estudo 28
4.2 Identificação dos locais (restaurantes) de coleta 29
4.3 Obtenção das amostras 29
4.4 Análises Microbiológicas 30
4.6 Análise de Histamina 33
4.7 Análise Estatística dos Dados 36
REFERÊNCIAS **37**
CAPÍTULO II **42**
Artigo segundo as normas da Revista de Saúde Publica **42**
CAPÍTULO III **62**
Artigo segundo as normas de Cadernos de Saúde Pública **62**
CAPÍTULO IV **76**
Artigo segundo as normas do Journal Food Control **76**
CONSIDERAÇÕES FINAIS **93**
ANEXOS **94**

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A alimentação do brasileiro é marcada por uma mescla resultante do processo de colonização e trocas culturais: de europeus, indígenas e africanos. Os modelos e mudanças dos hábitos e práticas alimentares referenciam o dinamismo social e definem o ato alimentar, não somente como necessidade nutricional, mas como um ato social (SANTOS, 2005).

A chegada de imigrantes japoneses ao Brasil, no início do século XX, marca a introdução da exótica culinária japonesa, inicialmente restrita a suas colônias e que passou a ser agregada ao paladar brasileiro, principalmente em locais de turismo, e ainda, inseridas no contexto de alimentação saudável, por associarem-se ao fator qualidade de vida e longevidade (RIBEIRO; PAOLUCCI, 2006).

O crescente o surgimento de lojas especializadas na culinária japonesa, atualmente comuns nos bairros de classes elevadas e nas metrópoles, e evidenciado pelo número de lojas presentes em shoppings, dentro da categoria de *fast-food*, e lojas na modalidade de entregas em domicílio "*delivery*" (VELLOSO, 2004), constitui fomento ao aumento no consumo de peixes no país e aquecimento da indústria do pescado, sobretudo aquicultura, que nas últimas décadas (1980-2010) se expandiu mundialmente com taxa de crescimento anual de 8,8%. O consumo mundial *per capita* de peixe aparentemente deverá atingir 19,6 Kg em 2021, 16% maior do que a média para 2009-2011 (FAO, 2012).

Usualmente, a população brasileira aprecia peixes, como o bacalhau da Noruega (*Cod fish* do mar do Norte) e o salmão do Chile - produzido em cativeiros (PORTAL BRASIL, 2014). O filé de merluza e o salmão do pacífico e do atlântico são os peixes importados em maior volume pelo Brasil, representando juntos 32% da demanda, em 2013 (SEBRAE, 2015), principalmente como peixe fresco ou refrigerado e congelado.

O pescado é a base proteica, de ótima qualidade e baixo teor de gordura, da maioria das preparações da culinária japonesa, sendo, o salmão, peixe rico em gordura poliinsaturada - ômega 3 (ω3) e ômega 6 (ω6) - e ainda em minerais e vitaminas, o mais consumido dos peixes na composição destas preparações, principalmente cru ou levemente coccionado. Este consumo demanda a necessidade de garantir a ingestão destes alimentos de forma segura do ponto de microbiológico e parasitário, haja vista, a ausência ou ineficiência da etapa de tratamento térmico, o que minimizaria ou eliminaria contaminações (NESPOLO; MARTINELI; ROSSI, 2012).

Doenças transmitidas por alimentos (DTA) são causadas por micro-organismos ou toxinas presentes em alimentos. O pescado pode veicular uma variedade de agentes

patogênicos ao homem e causar toxinfecções alimentares, sendo tratado como questão de saúde pública na atenção à qualidade sanitária de peixes e suas preparações (VALLANDRO, 2010). O pescado é dotado de fatores intrínseco, como, alto valor nutricional, atividade de água elevada, pH próximo a neutralidade, que podem facilitar o desenvolvimento microbiano e viabilizar a deterioração (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

No *post-mortem* e no período de estocagem as bactérias penetram a musculatura, com temperatura em torno de 0º C e, assim, inicia-se a proliferação de bactérias psicrófilas deteriorantes do pescado, como *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Moraxella*, etc., penetram na musculatura e iniciam sua proliferação (OGAWA; MAIA, 1999). A estatística dos sistemas de vigilância mostra aumento do número de casos de DTA em todo o mundo, independentemente da composição racial, grau de desenvolvimento, condição socioeconômica e cultural da população (VALENTE; PASSOS, 2004). Muitas pessoas são acometidas e nem sempre há causa evidente.

A ANVISA, através da Resolução n.º 12/01, regulamenta Padrões Microbiológicos para Alimentos e estabelece a tolerância de micro-organismos de interesse para amostra indicativa, respectivamente: coliformes a 45ºC – 10^2 NMP/g; *Staphylococcus* coagulase positiva – $5x10^3$ UFC/g; *Vibrio parahaemolyticus* (específico para produtos à base de pescados) – 10^3 UFC/g e *Salmonella* sp. ausência em 25g - para prato prontos para o consumo – a base de carnes, pescados e similares crus: quibe cru, *carpaccio*, *sushi*, *sashimi* [1], etc. (BRASIL, 2001).

A falta de boas práticas de higiene no processo produtivo, pode resultar na contaminação por bactérias causadoras de doenças (ICMSF, 1998). A qualidade dos alimentos pode estar diretamente associada a índices de toxinfecções além de outras doenças registradas no âmbito da saúde pública. A proliferação de bactérias de múltipla resistência a antimicrobianos – consequente do uso indiscriminado de medicamentos na aquicultura - é considerada agravo latente a espécie humana através do consumo de alimentos carreadores de bactérias resistentes a antimicrobianos de uso na rotina clínica (MOTA et al., 2005).

No período de 2007 a 2010, o estado do Maranhão notificou 24 surtos de DTA. Sendo 5 surtos em 2007, 11 em 2008, 1 em 2009 e 5 em 2010. Excluindo os surtos sem informação, 52,9% ocorreram em residências; 14,3% dos surtos foram causados pelo

[1] *Sushi* arroz pegajoso com vinagre, moldado em pequenos pedaços adicionado de peixe cru ou cozido (Salmão, atum e outros) ou formado em rolo com peixes ou legumes e envolto em algas marinhas. *Sashimi*, fatias delicadas de peixe cru (salmão, camarão, atum e outros) que é servido com apenas molho para mergulho (Po, 2007).

consumo de maionese e 28,6% por água. O agente etiológico foi isolado em 29,2% dos surtos notificados, sendo *Salmonella* spp. identificada em 3 surtos. Nesse período, ocorreram 15 óbitos decorrentes dos surtos. Estes dados enfatizam a existência de subnotificação dos casos de DTA ocorridos no estado (BRASIL, 2011).

A deterioração microbiana pode resultar na presença de histaminas no pescado, um determinante do grau de frescor deste alimento, implicando na qualidade do pescado comercializado pronto para consumo. Cuja determinação deve ser realizada por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE (OLIVEIRA, 2009). A intoxicação histamínica ou por escombrídeos, por estar associada à intoxicação após o consumo de peixes da família Escombrídea (SILVA, 2008), tem sido apresentada como causa de surtos em diversos países.

Segundo Badaró, Azeredo e Almeida (2007), cerca de 20 bilhões de dólares anualmente são gastos com DTA no Brasil. Considerando a subnotificação de casos e a deficiência de dados associados ao consumo de alimentos crus, a situação poder ser mais alarmantes. Portanto, estudos que determinem ou estimem a qualidade sanitária de alimentos consumidos crus, como pescado, são necessários para definir a qualidade de utilização desses produtos, as práticas de consumo e suas possíveis consequências ao estado de saúde da população.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Pesquisa de micro-organismos indicadores e patogênicos, suscetibilidade de isolados aos antimicrobianos e quantificação de histamina em filé de salmão (*Salmo salar*) sob a preparação de *sashimis*, coletados em restaurantes na cidade de São Luís - Maranhão.

2.2 Específicos

- Determinar o Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35ºC e a 45ºC;
- Pesquisar *Escherichia coli*;
- Realizar contagem e identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa;
- Pesquisar *Salmonella* sp.;
- Pesquisar *Aeromonas* spp.*;*
- Pesquisar *Vibrio parahaemolyticus;*
- Avaliar susceptibilidade *in vitro* a antimicrobianos;
- Determinar os teores de histamina por cromatografia líquida de alta eficiência.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Panorama econômico associado a produção e consumo de pescado

A pesca tem papel essencial na economia, sendo a aquicultura responsável por metade da produção de pescado consumido pela população no mundo. Os principais grupos de espécies de peixes usadas na piscicultura são carpa, tilápia, salmão e bagre (SEBRAE, 2015). Segundo a FAO, o pescado, através da pesca e da aquicultura, alimentou cerca de 60 milhões de pessoas na Ásia e África no ano de 2012.

A produção mundial de pescado em cativeiro alcançou mais de 90 milhões de toneladas em 2012, sendo a China o maior produtor no mundo com 43,5 milhões de tonelada de pescado. No mesmo ano, a produção aquícola no Brasil foi de 611.343 toneladas, correspondendo à décima segunda colocada no ranking mundial (FAO, 2014). A Ásia é destacadamente a maior produtora de pescado, com 91% do total produzido mundialmente, seguida da América com 3,5% e da Europa com 3,4%. Dentre os grupos de produção, evidenciam-se os peixes com 63,5% do volume total em 2012. Entretanto, os valores unitários são maiores para os crustáceos, seguido de peixes e moluscos, com 4,8 USD/Kg, 1,98 USD/Kg e 1,0 USD/Kg, respectivamente (SEBRAE, 2015; SIDÔNIO, 2012)

Segundo dados do IBGE, a piscicultura no Brasil, em 2013, produziu 392.493 toneladas de pescado, com representação do segmento em 82% da produção do país e taxa de crescimento de produção aquícola de 56% nos últimos 12 anos e equivalente econômico de aproximadamente 3 bilhões ao ano. A produção de peixes no Brasil é representada principalmente pelas tilápias e peixes redondos, que incluem tambaqui, tambacu, pacu e tambatinga. No entanto, a importação de pescado no Brasil tem sido crescente. Entre os anos de 2003 e 2013 registrou-se um aumento de 165% de importação, com um volume total de 144.489.260 toneladas de pescado, gerando uma receita adicional aos países exportadores de US$ 1.143.574.934, e aumento de 791% no valor dos pescados importados (SEBRAE, 2015).

O Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior (ALICEWEB), em 2013, destacou que os peixes merluza e salmão representaram juntos 32% do volume de pescados importados pelo Brasil. No país, o salmão apresenta notável valorização econômica, com elevado valor por quilo do peixe. Os Salmões originários da aquicultura marinha do Atlântico e do Danúbio, frescos ou refrigerados, representam a segunda espécie importada em volume, correspondente a US$ 368.681.859; as mesmas espécies sob congelamento ficam em nona colocação de volume de importação, correspondente a US$ 82.383.402, numa listagem de 108 espécies de pescado importadas pelo Brasil (SEBRAE, 2015).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o consumo de 12 Kg de pescado hab./ano. De acordo com a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) de 2008-2009, no Brasil, o consumo anual médio foi de peixe foi de 9,75 Kg. Com consumo médio domiciliar de 4,03 Kg *per capita*/ano e grande variação por regiões: 17,54 Kg no Norte, 4,96 Kg no Nordeste, 2,06 Kg no Sudeste, 1,60 Kg no Sul e 1,62 Kg no Centro-Oeste. Também foi verificado que somente 10,8% dos brasileiros declaram "o consumo fora do domicílio" (IBGE, 2010).

Nos últimos 50 anos, o consumo de peixes duplicou em relação ao crescimento populacional, apresentando taxa média de crescimento anual 3,2% no período 1961- 2013. Devido à disponibilidade *per capita*, o consumo de peixe alcançou as médias de 9,9 Kg no ano 1960, 14,4 Kg no ano 1990 e 19,7 Kg no ano 2013, com estimativas para 2014 e 2015 de média de 20 Kg disponível por pessoa (FAO, 2016).

O aumento do consumo de peixes, no Brasil, tem sido resultante de ações, que vão além do aumento na produção, pois estão associados a fatores como a redução de desperdício, melhoria nos canais de distribuição, baixo preço de algumas espécies importadas, maior demanda associada ao crescimento da população, melhores rendimentos e urbanização por meio de políticas públicas, e sobretudo pelo viés da "alimentação saudável", sob influência da culinária japonesa e com o aumento da disponibilidade e diversificação de novos produtos (FAO, 2016).

3.2 Fatores históricos sobre o consumo de peixe cru

O beneficiamento de alimentos oriundos do mar, como diversos peixes, moluscos e algas, constitui um hábito pregresso do povo japonês, especialmente por ser o Japão, um país formado por ilhas. Na culinária japonesa os peixes consistem em estimado ingrediente de pratos típicos como o *sashimi* e o *sushi* (GLOBO, 1993; SOARES; GAUDIOSO, 2013).

A alimentação japonesa remete à indispensável conservação de peixes por acidificação, inicialmente realizada por intermédio de técnicas asiáticas e chinesas. Em que, após a limpeza do peixe, somente a musculatura era filetada e conservada, por longos períodos, em barris de madeira com interpostas porções de arroz cozido. Este processo resulta na produção de ácido lático devido à fermentação do arroz, portanto acidificação do peixe. No consumo, o arroz era desprezado e o peixe era aproveitado (BARBER; TAKEMURA, 2008). No século XVII, este processo foi substituído pelo uso do vinagre e com a maior provisão de pescado tornou-se possível o consumo de peixe cru em preparações diárias (BARBER; TAKEMURA, 2011).

A culinária japonesa organizou-se sob a temática saudável, firmada basicamente em três alimentos: arroz, peixe e verduras (SILVA; SOARES; WOLF, 2011). Sua filosofia incuti a chamada “arte da culinária sem arte”, em que o alimento deve ser consumido preferencialmente na forma mais natural, a exemplo do *sashimi*. Portanto, aprecia-se a utilização de escasso tempero, preparo, consumo imediato e utilização de alimentos refrigerados, em detrimento de congelados (OKAMOTO; BUCK, 2002). Em tese, diverge da filosofia culinária francesa e chinesa, nas quais a arte culinária reflete a transformação do alimento natural em comestível, através do uso de técnicas criadas pelo homem (HALBWACHS, 1990).

No século XX, com a globalização, preparações da culinária japonesa ultrapassaram as fronteiras, com o surgimento de restaurantes, rodízios e outros. A partir de 1980, nos Estados Unidos, propala-se a ideia de alimentos saudáveis associada a essas preparações. Na culinária contemporânea, os *sushis* e *sashimis* sofrem pequenas modificações, através da adição de elementos culinários regionais, junto a técnica e criatividade do *sushiman* (BARBER; TAKEMURA, 2011), perfazendo um sucesso global (FREITAS et al., 2009).

3.3 Atual proveito no consumo de peixe cru no Brasil

A população das cidades brasileiras, em constante transformação de hábito alimentar, evidencia o crescente consumo de *sushi*, *sashimi* e preparações que incluem peixe cru (FREITAS et al., 2009; SANTOS et al., 2012), seguindo uma tendência mundial. Cuja oferta comercial não está restrita a restaurantes especializados da culinária japonesa, estando incluída também em cardápios de churrascarias, rodízios e outros (RODRIGUES et al., 2012).

O interesse por uma alimentação mais saudável é uma realidade para pessoas, independente do poder aquisitivo, portanto, influencia na obtenção de peixes pela população (SILVA, 2006). A relação do consumo de salmões com alimentação saudável advém principalmente das suas características nutricionais, como a composição lipídica de ácidos graxos poli-insaturados que atuam na prevenção de doenças. Scherr et al. (2015) buscaram determinar a composição de ácidos graxos e colesterol nos peixes mais consumidos no Brasil, provenientes do território nacional, e no salmão de cativeiro, na maioria, importado do Chile, e verificaram que o consumo de 253g/dia de salmão foi suficiente para atingir as recomendações de 2.000mg/dia do ácido graxo -3 para prevenção de doença cardiovascular.

Lopes, Oliveira e Ramos (2016), evidenciaram, com dados das cinco macrorregiões, o consumo de peixes no Brasil, destacando-se o peixe grelhado (48,1%),

assado (42,2%) ou frito (40,4%), seguido de peixes crus (29,5%), que ocorre tipicamente em restaurantes e com peixes específicos, como o salmão do atlântico e pacífico - predominantemente adquirido por importação. Desta maneira, o processamento, o preparo e a oferta desse produto repercutem no aumento do seu consumo.

Diversos fatores, pertinentes à conservação e aspectos de consumo do peixe cru, apresentam o produto como preocupação à saúde pública. Dentre estes. Pode ser citada a verificação de contaminação parasitária dos mesmos. Melo et al. (2014) na cidade de Fortaleza - CE, cidade turística e grande consumidora de peixe cru na culinária japonesa, verificaram a prevalência de contaminação em 75% das amostras de *sashimi* (12), comercializadas em supermercados da cidade, foram identificados parasitas das classes: Cestoda 58,3%; Nematoda 25% e Trematoda 58,3%, sendo as amostras de *sashimi* consideradas como alimentos impróprios ao consumo humano.

Alimentos consumidos crus são considerados de elevado risco sanitário, por não serem previamente submetidos à cocção, o que exige medidas sanitárias específicas e rigorosas quanto à aplicação de boas práticas de produção, preparo e comercialização. Assim, municípios como Porto Alegre - RS mostrando preocupação com agravos à saúde, pelo crescente número de consumidores de peixes crus e considerando a complexidade e peculiaridade relacionadas ao consumo de *sushis* e *sashimis* e demais itens da culinária japonesa, regulamentou recentemente, através da Portaria – SMS n.º 1109 de 23 de agosto de 2016, diretrizes especificas a este nicho de consumo, como por exemplo, a manutenção sob temperaturas inferiores a 5ºC, imediatamente antes de sua exposição, devendo haver registro de cada monitoramento (PORTO ALEGRE, 2016).

3.4 Deterioração do Pescado

Peixe fresco, de acordo com a Portaria MAPA n.º 185/1997 é definido como produto obtido de espécimes saudáveis e de qualidade apropriada ao consumo humano, adequadamente lavado e conservado somente pelo resfriamento a uma temperatura próxima à do ponto de fusão do gelo. Além disso, deve apresentar características como: escamas brilhantes e aderentes à pele e barbatanas com certa resistência aos movimentos; carne firme e de consistência elástica; coloração própria à espécie; vísceras íntegras perfeitamente diferenciadas; musculatura da parede abdominal não deve apresentar autólise; odor específico, a fazer lembrar o de plantas marinhas; superfície do corpo limpa, com relativo brilho metálico; olhos transparentes, brilhantes e convexos, ocupando completamente as órbitas;

brânquias rosáceas ou vermelhas, úmidas e brilhantes; ventre roliço e firme, não deixando impressão duradoura à pressão dos dedos; e ânus fechado.

Machado et al. (2010) verificaram que da captura à comercialização do pescado, existem falhas no que diz respeito a medidas higiênico-sanitárias, que são atribuídas ao despreparo dos pescadores, e sugeriram a instauração de políticas públicas que envolvam capacitação, criação e implantação de guias de Boas Práticas de Produção (BPP). Os pesquisadores destacaram, ainda, a necessidade de intervenções da cadeia de produção, com o envolvimento imprescindível de pescadores, instituições de pesquisa e saúde, comércio e consumidores.

Usualmente os produtos da pesca sofrem alterações de qualidade a partir da captura, especialmente quando a atividade ocorre em condições inadequadas o que pode favorecer a deterioração precoce (SOARES; GONÇALVES, 2012). Estas alterações incluem a autólise, alterações químicas, microbiológicas e sensoriais. No processo de deterioração, os sinais de alteração no peixe são evidenciados pela identificação de aromas e sabores desagradáveis, formação de muco, produção de gás, coloração anormal e modificações na textura dos tecidos (HUSS, 1995). Cuja velocidade de ocorrência é consonante aos aspectos intrínsecos e extrínsecos do produto, ou seja, para o pescado, atividade de água em torno de 80%, pH de no máximo 6,8, pouco tecido conjuntivo, ação de enzimas endógenas - agentes de decomposição proteica e ação microbiana (BRASIL, 1994; OGAWA; MAIA, 1999).

O pescado é classificado como alimento de alto risco por ser um potencial veículo de micro-organismos patogênicos causadores de DTA. As DTA, são agravos à saúde resultantes do consumo de alimentos contaminados por patógenos (infecciosos, toxinogênicos ou infestantes), com substâncias químicas, objetos lesivos ou constituídos com estrutura naturalmente tóxica, ou seja, são doenças consequentes à ingestão de perigos biológicos, químicos ou físicos presentes nos alimentos (SILVA JUNIOR, 2014).

A deterioração é um acontecimento volúvel, determinado pela composição nutricional do alimento e multiplicação microbiana, que abrevia o surgimento de diversos metabólitos, como amônia e aminas biogênicas (PEREIRA, 1997). É favorecido pelo não uso de refrigeração ou uso de temperaturas inadequadas, más condições de higiene, errôneo acondicionamento do pescado quando manuseado e transportado, assim como a contaminação dos meios aquáticos de onde este pescado foi originado (SOARES et al., 1998).

Os processos de deterioração química de maior significado sobrevêm da oxidação de lipídios insaturados, com formação de hidroperóxidos que podem levar ao aparecimento de colorações castanhas ou amarelas no tecido do peixe e produção de peróxidos, aldeídos e

cetonas e ácidos graxos de cadeia curta que ocorrem principalmente no período de armazenamento inadequado do peixe (PEREDA et al., 2005).

3.5 Perigos microbiológicos no pescado cru

3.5.1 Caracterização de micro-organismos encontrados no pescado

A microbiota presente no pescado reflete o ambiente de onde ele foi extraído e o modo de captura, sendo a temperatura um fator seletivo (GERMANO et al., 1993); GRAM; MELCHIORSEN, 1996). Peixes de água morna apresentam, em sua maioria, bactérias mesófilas gram-positivas; os peixes de água fria apresentam principalmente bactérias gram-negativas (JAY, 2005). A deterioração do pescado acontece especialmente devido à presença de bastonetes gram-negativos não esporulados pertencentes aos gêneros: *Pseudomonas, Actinobacter, Moraxella* e *Flavobacterium* (VIEIRA; SAKER-SAMPAIO, 2003).

Outras bactérias encontradas são os coliformes, *Clostridium* sp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Vibrio,* que podem ser oriundas do ambiente, processamento e/ou armazenamento incorretos, contaminação cruzada e contaminação por manipulação (HOFFMANN; GARCIA-CRUZ; VINTURIM, 1999). A análise de *Salmonella* spp., mesófilos e coliformes é utilizada para avaliação da qualidade dos produtos, assim como *Staphylococcus aureus* que produz enterotoxinas, resistentes à cocção, associadas com intoxicação alimentar (SILVA, N; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007). O peixe fresco ou resfriado é prioritariamente deteriorado por bactérias, assim como os fungos são os principais deterioradores de peixes salgados e secos (JAY, 2005).

Segundo Leatherhead Food Internacional (2009) as bactérias autóctones abundantes no meio aquático de diversas partes do mundo são: *Clostridium botulinum; Vibrio cholerae; V. parahaemolyticus; V. vulnificus; V. hollisae; V. furnsii; V. mimicus; V. fluvialis; Aeromonas hydrophila; Plesiomonas shigelloides* e *Listeria monocytogenes*; além das patogênicas, que também podem estar presentes na microbiota inicial dos peixes. Bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae são contaminantes do pescado especialmente oriundas do ser humano e animais, por contaminação direta, poluição das águas naturais ou de ambiente aquático e esgoto (WHO, 2012).

No Brasil, a Resolução n.º 12/2001 - ANVISA, estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos, em seu item 22b, apresenta as bactérias que devem obrigatoriamente ser analisadas em alimentos à base de carnes, pescados e similares crus (quibe cru, *carpaccio, sushi, sashimi,* etc.): coliformes a 45ºC/g, *Staphylococcus* coagulase

positiva/g, *V. parahaemolyticus/g* (específico para produtos à base de pescado) e *Salmonella* sp./25g.

3.5.2 Caracterização da microbiota para pescado consumido cru

3.5.2.1 Coliformes a 35ºC e a 45ºC

O grupo de coliformes a 35ºC, também chamados de totais, abrange os bastonetes Gram-negativos, não formadores de esporos, aeróbios facultativos, fermentadores de lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35ºC. Incluem bactérias do trato gastrintestinal de humanos e outros animais homeotérmicos, assim como bactérias de vários gêneros e espécies não entéricas como a *Serratia* e *Aeromonas*. A presença desse grupo nos alimentos e água indica contaminação pós-sanitização ou pós processo térmico controlado e evidencia realização de deficiente procedimento de higiene e sanitização (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007). O grupo é composto principalmente por bactérias dos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

O grupo de coliformes a 45ºC ou termotolerantes, estão incluídos no grupo maior, ou seja, coliformes totais, com especificidade de fermentação de lactose com produção de gás a 44,5 a 45,5ºC em 24 a 48 horas. *Escherichia coli* é a bactéria mais facilmente identificada neste grupo (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007). Em alimentos frescos de origem animal, elevada contagem de membros da família Enterobacteriaceae pode indicar contaminação por manipulador, higiene e ou armazenamento inadequado (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

3.5.2.2 *Escherichia coli*

E. coli é uma bactéria da família Enterobacteriaceae, considerada o melhor indicador de contaminação por resíduos fecais e, portanto, indica que os alimentos estão em condições higiênicas insatisfatórias. Bacilo Gram-negativo, não esporulado, anaeróbio facultativo, habitante do trato intestinal de humanos e de animais de homeotérmicos. Exibe antígeno somático O, associado com polissacarídeos da membrana externa e antígenos flagelares H, associados com proteínas dos flagelos. Pode, ainda, exibir antígenos K, associados com polissacarídeos capsulares (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

E. coli apresenta diversas estirpes comprovadamente patogênicas ao homem e animais. Estas são identificadas por seus fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiologia, sendo: *E. coli* Enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Entero-hemorrágica (EHEC) e *E.*

coli Enteroagregativa (EAEC), *E. coli* que adere difusamente as células epiteliais (DAEC), *E. coli* aderente invasiva (AIEC) e *E. coli* produtora de Shiga (STEC). (CLEMENTS et al., 2012; NGUYEN; SPERANTO, 2012).

3.5.2.3 *Staphylococcus* sp.

Os micro-organismos do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos (em aerobiose produzem catalase), da família Micrococcaceae, que à microscopia apresentam-se na forma de cacho de uva. (FRANCO; LANDGRAF, 2008). A contagem de *Staphylococcus aureus* pode estar relacionada ao controle de qualidade higiênico sanitária, e em saúde pública, relacionada surtos de intoxicação alimentar, devido a enterotoxina estafilocócica (SILVA, N; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007; FRANCO; LANDGRAF, 2008). Multiplicam-se a temperaturas compreendidas entre 18ºC e 40ºC com uma temperatura ótima de 35ºC e o pH ótimo entre 6 e 7, porém, multiplicam-se ao pH de 4,0 a 9,8 (JAY, 2005).

3.5.2.4 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* spp. pertence à família Enterobacteriaceae. São bastonetes curtos, Gram-negativo, fermentadores de glicose, não esporulados, na maioria móvel por flagelos peritríquios, de metabolismo aeróbio ou facultativamente anaeróbio e que se multiplicam a temperaturas entre 35 a 37°C e pH ideal igual a 7. São causa de salmoneloses, por ingestão de alimentos geralmente de origem animal, água, e eventualmente diretamente pelo contato com animais ou entre humanos (ANVISA, 2008).

O ambiente natural de *Salmonella* spp. é o trato gastrintestinal de mamíferos, aves e répteis. O pescado, então, é contaminado, quando os ambientes aquáticos são atingidos por resíduos fecais (SANATH-KUMAR et al., 2003).

3.5.2.5 *Vibrio parahaemolyticus*

Pertencentes ao gênero *Vibrio* e família Vibrionaceae são bacilos Gram-negativos, retos ou curvos e móveis, facultativos anaeróbicos e sensíveis à desidratação e calor. Multiplicam-se em pH ótimo, entre 7,5 e 8,5 e à temperatura ótima de 37ºC, no entanto podem crescer a temperaturas de 5º a 43ºC. São halofílicos e à concentração de 3% de cloreto de sódio – atividade de água de 0,992 – apresentam excelente multiplicação. *Vibrio parahaemolyticus*, apresenta papel bastante definido em casos de toxinfecções alimentares (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

O Japão tem o peixe cru como principal alimento veiculador de *V. parahaemolyticus*, mesmo a baixas temperaturas. Sendo este micro-organismo associado a surtos decorrentes do consumo de alimentos de origem japonesa crus ou parcialmente cozidos (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Mesmo quando inicialmente pouco numerosos, multiplicam-se rapidamente sob condições impróprias de captura, processamento, distribuição e armazenamento (WHO, 2012).

3.5.2.6 *Aeromonas sp.*

O gênero *Aeromonas* pertence à família Vibrionaceae, móvel geralmente monotríquio. São bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, produtoras de oxidase e catalase, fermentadores de glicídios com produção de ácido e gás. Com temperatura ótima de crescimento a 28ºC, num intervalo de 5 a 42ºC o que torna esse micro-organismo especial à saúde pública, por ser temperatura adequada ao crescimento do micro-organismo.

Aeromonas spp. tem sido apontada como como causa de DTA (FRANCO; LANDGRAF, 2008), associadas a ingestão de alimentos e água contaminados. De acordo com Centro de Vigilância Epidemiológica – CVE/SP a *Aeromonas* é considerada um patógeno entérico emergente, na lista de contaminantes importantes para a saúde pública pela Agência de Proteção Ambiental, pois tem capacidade de crescimento nos sistemas de distribuição de água, especialmente em biofilmes, onde pode ser resistente à cloração.

A patogenicidade do *Aeromonas* spp. é devida a diversos fatores, como: enterotoxina citotônica termolábil (*alt*), enterotoxina citotônica termoestável (*ast*), enterotoxina termolábil citotóxica (*act*), aerolisina (*aera*), flagelos A e B (*fla*), lipase (*lip*), elastase (*ela*), serina protease (*ser*), toxina Adp - ribosiltransferase (*aexT*) e DNases (*exu*) (PUTHUCHEARY; PUAH; CHUA, 2012).

Aeromonas spp. causa de infecção direta em humanos, pode ser identificada em material fecal de humanos e animais, solo, água e alimentos, especialmente os de origem animal, por falha em sua obtenção ou processamento (JANDA; ABBOTT, 2010). Segundo o CVE/SP, *Aeromonas hydrophila* pode causar gastroenterite em humanos saudáveis ou infecção generalizada em imunodeprimidos. *A. hydrophila* é frequentemente encontrada em peixes e moluscos. Também foi encontrada em amostras de carnes vermelhas (bovina, suína e carneiro) e frango.

3.5.3 Fatores que influenciam a microbiota do pescado

O pescado é qualificado pelo seu frescor, ou seja, seu estado de conservação, que está intimamente ligado a fatores que podem alterar a microbiota nele existente (SOARES;

GONÇALVES, 2012). Os fatores que definem o crescimento de micro-organismos no pescado, assim como em outros alimentos, são ordenados como extrínsecos e intrínsecos, ou seja, fatores relacionados a condições ambientais a que o alimento está submetido e fatores relacionados ao próprio alimento, respectivamente (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

3.5.3.1 Fatores Extrínsecos

Um essencial fator ambiental que influencia é a temperatura, em que micro-organismos podem desenvolver-se a temperaturas muito diversificadas, com evidencias de multiplicação microbiana a temperaturas mínimas de -35ºC e máximas de 90ºC, sendo classificados de acordo com a melhor temperatura de multiplicação (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Oetterer (2002), afirmou que o tempo conservação útil do peixe a 0°C é de 8 dias, a 22°C de 24 horas e a 38°C de 12 horas. Oliveira et al. (2014) encontraram como tempo de conservação útil do pirarucu, estocado em gelo, o prazo de 27 ± 0,5 dias.

Existem outros fatores como a umidade relativa do ar, composição gasosa e demais que devem ser de total conhecimento quando o objetivo é a conservação do pescado, por configurarem-se em determinantes na proliferação de micro-organismos, sejam estes deteriorantes, patogênicos e/ou toxigênicos, e que possam estar presentes nos alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Intimamente relacionados ao tipo de captura, transporte e armazenamento (GERMANO; GERMANO, 2008).

3.5.3.2 Fatores Intrínsecos

A acelerada deterioração do pescado cru tem como principais fatores intrínsecos envolvidos: a composição nutricional do pescado rico em proteína de alta qualidade que contém todos os aminoácidos essenciais, gorduras insaturadas e em muitos casos rico em ácidos graxos ômega-3, vitaminas lipossolúveis A e D, minerais cálcio, fósforo, ferro, cobre, selênio e, no caso dos peixes de água salgada, iodo (FAO, 2016); a atividade de água elevada, >0,98 (FRANCO; LANDGRAF, 2008); o pH próximo a neutralidade, a exemplo o salmão com pH 6,1 a 6,3 (JAY, 2005). Assim, o pescado configura-se em alimento altamente compatível ao desenvolvimento de micro-organismos.

3.6 Suscetibilidade *in vitro* aos antimicrobianos

De acordo com a ANVISA, os antimicrobianos são pertencentes a uma classe de medicamentos que é consumida no tratamento de infecções. Portanto, são agentes medicamentosos que afetam seus utilizadores, humanos ou animais, e interferem de forma

significativa o ambiente de uso, pois alteram a ecologia microbiana. O entendimento dos antimicrobianos, princípios e propriedades orientam seu uso e escolha terapêutica adequada.

O emprego de antimicrobianos, na prevenção e terapêutica de doenças, é acentuado na aquicultura e resulta em aumento na resistência bacteriana a inúmeros medicamentos, como no caso de espécies de *Aeromonas* sp. (CHAUDHURY et al., 1996). O que pode prejudicar o tratamento de indivíduos acometido por bactérias veiculadas por estes alimentos.

A atividade microbiana é o principal fator causal de deterioração dos alimentos e diretamente relacionado a diminuição de qualidade e segurança do produto. Micro-organismos como *E. coli* O157: H7, *S. aureus*, *S.* Enteritidis e *L. monocytogenes* são patógenos importantes no contexto de Saúde Pública mundial por estarem associados a DTA (HALL, 1997). Nos alimentos, muitos métodos são aplicados com o intuito de bloquear ou controlar o crescimento destes micro-organismos, compreendendo o uso de processos físicos, biológicos ou químicos. Além destes tem havido a crescente busca por substâncias naturais com ação antimicrobiana, que possam ser utilizadas na indústria alimentícia (RAWDKUEN et al., 2012).

Os antimicrobianos testados seguem as recomendações para cada grupo de organismos e incluem agentes de eficácia comprovada que se mostram aceitáveis no desempenho do teste *in vitro*. Considerações na atribuição de agentes a grupos de teste / relatório específicas incluem a eficácia clínica, prevalência de resistência, minimizando o surgimento de resistência, custo, indicações clínicas do FDA (2011) para uso e recomendações de consenso atuais para medicamentos de primeira escolha e alternativos. Com resultados interpretativos (suscetível, intermediária ou resistente) e semelhante eficácia clínica (CLSI, 2015).

3.7 Histamina em alimentos

No processo de deterioração há a formação de histamina, uma amina não volátil, resistente ao tratamento térmico e detectado em níveis baixos em pescado recém capturado (PEREIRA, 1997). A histamina é agente de intoxicação alimentar ou escombróide, resultante da descarboxilação de histidina por ação de enzimática, de origem bacteriana, principalmente Enterobacteriaceae (FAO, 2012). A *Food and Drug Administration* (FDA) estabelece o limite máximo de 50mg/Kg de histamina no peixe fresco. Nos países do MERCOSUL o nível máximo permitido é de 100ppm no músculo nas espécies das famílias Scombridae, Scombresocidae, Clupeidae, Coryyphaenidae e Pomatomidae (BRASIL, 1997).

As bactérias formadoras de histamina são capazes de produzi-la a várias temperaturas, principalmente > 21,1°C e particularmente acelerado a ± 32,2°C, no entanto, também podem produzir a ≥7,2ºC. Uma vez que a enzima descarboxilase de histidina está presente no peixe, pode continuar ativa, independente da presença da bactéria. A mesma é estável ao congelamento e pode ser reativada no descongelamento. A enzima é inativada pelo calor, assim como a bactéria, porém a histamina não, incluindo temperatura de esterilização, e se mantém estável sob congelamento. A histamina é um importante indicador de decomposição de peixes, em geral associada a alterações sensoriais (FDA, 2011).

A formação de histamina nos tecidos dos peixes é atribuída a diversos micro-organismos. Dentre estes as bactérias mesófilas são suas principais formadoras, capazes de produzir mais de 500 mg/Kg após 48h (KIM et al., 2001); no entanto, bactérias psicrófilas (*P. iliopiscarium*) são capazes de produzir níveis superiores a 500 mg/Kg a 5ºC /72h, 10ºC /36 h e 20ºC /18 h (TAKAHASHI et al., 2015).

Os principais sintomas da intoxicação escombróide são resultantes da quantidade de histamina ingerida, sensibilidade individual e capacidade de desintoxicação do organismo. E ocorrem logo após o consumo (até 2h) e envolvem alterações no sistema cardiovascular, queimação na boca, urticária, rubor, cefaléia, secreção nasal, broncoespasmo, taquicardia, edema, prurido, náusea, vômito e diarreia (LOHIYA et al., 2015; HUNGERFORD, 2010).

A presença de histamina no pescado, um determinante do grau de frescor deste alimento, deve ter determinação realizada por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC (OLIVEIRA, 2009). O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de determinar o Número Mais Provável por grama (NMP /g) de mesófilas do grupo de coliformes a 35ºC e a 45ºC, identificação de *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. de amostras de *Sashimi* de Salmão (SS) (*Salmo salar*) e identificação de histamina. Visando contribuir para o conhecimento da microbiota e quantificação de histamina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

As amostras de *sashimi* de salmão (*Salmo salar*) foram obtidas diretamente em restaurantes, especializados em culinária japonesa, localizados no munícipio de São Luís – MA. Os restaurantes foram identificados a partir de listagem emitida pela Secretaria Municipal de Saúde – Coordenação de Vigilância Sanitária, onde contavam todos os restaurantes registrados no departamento no ano de 2015. Destes foram identificados os

restaurantes de culinária especificamente japonesa, totalizando 42 restaurantes, e selecionados - de acordo com a disponibilidade do produto *sashimi* - 10 restaurantes para a pesquisa.

4.2 Identificação dos locais (restaurantes) de coleta

Os restaurantes foram visitados para confirmação de venda do produto de pesquisa e identificados como: **R1**, **R2**, **R3**, **R4, R5**, **R6, R7, R8**, **R9 e R10**. E georreferenciados utilizando-se o equipamento GPS 072 ETREX 20, *Garmin* (**Figura 1**).

Figura 1: Mapa dos locais de coleta de amostras no município de São Luís – MA. 2017

4.3 Obtenção das amostras

Foi coletada em cada restaurante, uma amostra por vez, sendo repetidas as coletas por seis vezes, ou seja, seis amostras da preparação por restaurante– em blocos de 10 amostras (R1 a R10). No total foram coletas 60 amostras. O ensaio foi conduzido em arranjo fatorial 10x6 (dez estabelecimentos x seis períodos de amostragem).

As amostras foram coletadas através da compra das mesmas, em embalagem descartável de serviço *delivery* própria de cada estabelecimento. E acondicionadas em caixa isotérmica com gelo reciclável e transportadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água – Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), para realização das análises.

Após a realização das análises microbiológicas pelo método *American Public Health Association* (APHA), descritas no *Compendium of Methods for de Microbiological Examination of Foods* (VANDERZANT; SPLITTS – TOESSER, 1992).

4.4 Análises Microbiológicas

No laboratório as amostras de *sashimi* de salmão foram retiradas de suas embalagens de transporte. Foram pesadas assepticamente quatro porções de 25g para cada amostra, seguindo o procedimento de cada análise.

4.4.1 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35ºC e 45ºC

Uma porção de 25g de cada amostra foi adicionada em um frasco contendo 225mL e água peptonada (Kasvi) (diluição 10^{-1}). A partir desta diluição, foram preparadas outras diluições retirando-se uma alíquota de 1 mL, adicionada à 9mL de água peptonada em tubo de ensaio, para obtenção de diluição 10^{-2} e assim sucessivamente para a diluição 10^{-3}.

Das diluições decimais, foi inoculado 1mL em três séries de tubo de ensaio, com tubo de Durhan invertido, contendo caldo Lauril Sulfato Triptose (Merck). Estes foram incubados em estufa bacteriológica a 35ºC $\pm$ 1ºC por 24 a 48h. Foram considerados como positivos na prova presuntiva, aqueles tubos com turvação e produção de gás. Para confirmação, dos testes de coliformes a 35ºC, alíquotas das culturas positivas do caldo LST foram alçadas e transferidas para tubos contendo caldo lactose Verde-Brilhante bile a 2% (VB) (Neogen). Estes foram incubados igualmente aos anteriores, sendo considerados positivos os tubos que apresentaram turvação e produção de gás.

Para confirmação dos testes de coliformes a 45ºC, alíquotas das culturas positivas no caldo Lauril Sulfato Triptose foram alçadas para tubos contendo caldo EC (*Escherichia coli*) (Himedia). Estes foram incubados em banho-maria a 44,5ºC por 24 a 48h e considerados positivos os tubos que apresentaram turvação e produção de gás. E em seguida foi determinado o Número Mais Provável por grama (NMP/g) de alimento, conforme tabela de Hoskis (BRASIL, 2001).

4.4.2 Pesquisa de *Escherichia coli*

Para a pesquisa de *Escherichia coli* nas amostras de *sashimi*, foram retiradas alíquotas de cada tubo positivo de Caldo EC e semeadas em placas contendo ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (Himedia) e incubadas em estufa bacteriológica de 35°C por 48h. Observando-se o desenvolvimento de colônias típicas (nucleadas com centro preto e brilho verde metálico), foram transferidas duas colônias isoladas para tubos de Trypticase Soy Agar

(TSA) (Isofar) inclinado e incubados em estufa a 35°C por 24h. A partir destas culturas foi realizada coloração de Gram (Kit Laborclin, Paraná, Brasil). Para bacilos Gram-negativos identificados, seguiram-se provas bioquímicas (INViC): Indol, Vermelho de metila, *Voges-Proskauer* e Citrato.

4.4.3 Contagem e identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva

A partir das diluições decimais (10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}) de água peptonada, alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas sobre a superfície de placas contendo ágar Baird-Parker (BP) (Neogen), adicionado de telurito de potássio e emulsão de gema de ovo, distribuído em toda a placa com auxílio de alça de Drigalsky, e as mesmas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 48h.

Após este período, realizou-se a contagem do número de colônias que apresentavam características típicas do gênero (colônias pretas definidas rodeadas com halo claro) e a contagem das colônias atípicas (colônias pretas definidas). As colônias típicas de *Staphylococcus* foram submetidas aos testes de catalase, coloração de Gram e coagulase, sendo considerado resultado positivo quando houve a formação de grumos - aglutinação (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997).

4.4.4 Pesquisa de *Salmonella* sp.

A diluição (10^{-1}) em água peptonada foi incubada em estufa bacteriológica a 35°C por 24h. Em seguida, foi feito o enriquecimento seletivo, transferindo-se alíquota de 1 mL para o caldo *Rappaport-Vassiliadis* (Kasvi) e 0,1mL para o caldo Selenito Cistina (Kasvi). A partir do crescimento nos meios de enriquecimento, foram realizadas semeaduras em meio ágar Entérico de Hektoen (HE) (Himedia) e ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) (Himedia) para plaqueamento seletivo. As mesmas foram incubadas em estufa de 35°C por 24h, verificando-se se houve formação de colônias típicas (em HE, colônias transparentes, verde azuladas com ou sem centro preto; em XLD, colônias transparentes, cor de rosa escuro, com ou sem centro preto). Após este período seguiu-se a identificação bioquímica, em ágar Triplice Sugar Iron (TSI) (Isofar) e Lysine Iron Agar (LIA) (Isofar) e teste sorológico polivalente anti-salmonela – Probac do Brasil - (Somático e Flagelar), considerado positivo para o teste a reação de soroaglutinação, caracterizada por formação de grumos.

4.4.5 Pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus*

A pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* foi realizada a partir da homogeneização da segunda porção de 25g da amostra adicionada à 225mL de água peptonada salina - NaCl

(3%). A partir dessa solução foram produzidas diluições seriadas até a 10^{-4}, transferindo-se alíquota de 1mL da mistura para tubos contendo 9mL de água peptonada salina – NaCl (3%), em triplicata e incubados durante 18 a 24h a 35 - 37°C.

A partir das diluições que apresentaram crescimento, coletou-se da superfície do meio, com alça bacteriológica, a película formada de cada tubo, sem agitar o líquido, que foi semeada em Ágar tiossulfato-citrato-bile-sacarose (TCBS) (Neogen). As placas foram incubadas invertidas por 24 horas em estufa a 35 - 37°C.

Foi selecionado 3 a 4 colônias típicas sacarose negativa de *V. parahaemolyticus* caracterizadas por colônias redondas, opacas, verdes ou azuladas, com 2 a 3mm de diâmetro. Para teste em ágar TSI com NaCl (3%), este foram incubados por 18 a 24 horas a 35 - 37°C. A partir do ágar TSI, foram feitos teste de Gram para identificação de morfologia e Meio Teste de Motilidade (BD-USA) com NaCl (3%), incubados por 18 a 24h a 35 - 37°C. Seguindo-se provas bioquímicas para testes positivos para o *V. parahaemolyticus* (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007).

4.4.6 Pesquisa de *Aeromonas* spp.

Utilizou-se a terceira porção de 25g da amostra, adicionando-a a 225mL do caldo Tripticase Soja (TSB) e incubou-se a 28°C por 24h. Após este período, foram semeadas alíquotas do crescimento bacteriano em placas contendo ágar Vermelho de Fenol-amido-ampicilina (Himedia) (MAJEED et al., 1990; PALUMBO et al., 1991) e Ágar Dextrina-ampicilina (Himedia), segundo Havelaar e Vonk (1988), adicionadas de ampicilina (10mg/L) e incubadas a 28°C por 24h.

Para isolamento das colônias e identificação presuntiva do gênero foram selecionadas até três colônias típicas, em cada um dos meios que foram utilizados e semeados em ágar TSA inclinado e incubados a 28°C por 24 h. Após a incubação foi realizada a coloração pelo método de Gram e selecionadas as culturas que se apresentaram na forma de bastonetes retos e curtos, aos pares, isolados ou em cadeias curtas e Gram negativas. Estas foram repicadas em ágar TSI (SAAD et al., 1995) e incubadas a 28°C por 24h, sendo consideradas positivas as culturas que apresentarem reação ácida na base e bisel. As culturas positivas foram submetidas à prova de oxidase e catalase.

O teste da oxidase foi realizado conforme as instruções do fabricante (NewProv). A prova de catalase consistiu na transferência da colônia com a alça de níquel-cromo previamente flambada, para uma lâmina de vidro, sobre a qual foi adicionada uma gota de

peróxido de hidrogênio. A reação positiva foi caracterizada pela observação do borbulhamento imediato, como resultado de liberação de oxigênio molecular.

As cepas positivas nesses dois testes foram consideradas como pertencentes ao gênero *Aeromonas* e submetidas às provas bioquímicas para a identificação das espécies (*A.schubertii, A. caviae, A. trota, A. hydrophila, A. jandaei, A. veronii biovar veronii*), segundo a chave de identificação Aerokey II (CARNARHAN et al., 1991) segundo os testes: hidrólise da esculina, produção de indol, produção de gás a partir de glicose, produção de ácido a partir da arabinose, Voges-Proskauer, e sacarose e resistência à cefalotina (30µg).

4.5 Susceptibilidade in vitro (CLSI, 2015)

Utilizar meios e discos a temperatura ambiente. Suspender com uso de alça bacteriológica colônias recentes em solução salina estéril (NaCl 0,85%) até se obter uma turvação compatível com o grau 0,5 da escala *Mac Farland* (1x106 UFC/mL). Com uso de swab estéril semear a suspenção bacteriana em toda a superfície de placas de ágar de meio Mueller Hinton (MHA) em platina devidamente flambada e resfriada, tocar na colônia recente (18-24h). Com auxílio de pinça colocar os monodiscos de antibiograma, sobre a superfície do meio inoculado. Incubar a placa com os discos em estufa bacteriológica a 35ºC $\pm$ 2ºC por 16 a 18 horas. Com o auxílio de uma régua, realizar medida do diâmetro dos halos inibitórios de cada disco, e com uso de tabela apropriada para determinar se a bactéria em análise é sensível, intermediário ou resistente ao antimicrobiano testado.

Os antibióticos testados seguiram as recomendações para cada grupo de organismos e incluíram: Grupo A (Ampicilina 10µg e Gentamicina 120 µg) e Grupo B (Amicacina 30 µg, Amoxilina-clavulanato 20/10 µg, Cefuroxima 30 µg, Cefepime 30 µg, Cefoxitina 30 µg, Cefotaxima 30 µg, Levofloxacina 5 µg, Pireracilina 100 µg, Sulfa-Trimetoprim 25 µg). Os agentes do grupo A são considerados apropriados para inclusão de rotina, testes de painel principal, bem como para a comunicação de rotina de resultados para os grupos de organismos específicos. O Grupo B inclui agentes antimicrobianos que podem justificar testes primários, mas eles podem ser reportados apenas seletivamente, ou seja, quando o organismo é resistente a agentes da mesma classe de antimicrobianos do Grupo A.

4.6 Análise de Histamina

Foram obtidas 60 amostras de sashimi de salmão de restaurantes especializados, localizados no munícipio de São Luís – MA. Os restaurantes foram identificados a partir de listagem emitida pela Secretaria Municipal de Saúde – Coordenação de Vigilância Sanitária, destes foram selecionados 10 restaurantes especializados em culinária japonesa para a

pesquisa, de acordo com a disponibilidade do produto *sashimi*. Identificados como: R1 a R10. O ensaio foi conduzido em arranjo fatorial 10x6 (dez estabelecimentos x seis períodos de amostragem).

4.6.1 Metodologia de análises

As amostras foram picadas e segregadas em porções de 25g, em que uma porção foi utilizada para análise microbiológicas e outra porção foi recolhida em placa de petri estéril, identificadas e congelada, para análise de histamina, de cada amostra.

4.6.2 Análise de histamina

A amina biogênica foi identificada e quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência, em equipamento HPLC *proeminence* (LC-10AT, SPD-M20A, CTO-20A, CBM-20A e DGU-20A_{5R}) (Shimatzu, Japão), cuja derivatização foi de acordo com a metodologia descrita por Ben-Gigirey et al. (1998), com adaptações. Para extração - As amostras avaliadas, foram descongeladas sob refrigeração e seguiu-se homogeneização sob equipamento tipo Turrax NT138 (Novatecnica, Brasil); do homogeneizado pesou-se 1,0g em balança analítica, sendo transferido para tubo de polipropileno de 50mL. Adicionou-se 2,0mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5% mol/L (Dinâmica) e agitou-se em *vortex* por 1min. Submeteu-se a Centrifuga 420R (Hettich, Brasil) 6min, 4ºC e 11000rpm, retirou-se o sobrenadante para tubos de polipropileno 15mL.

Condições de derivatização. A 1ml de solução padrão de trabalho ou extrato de amostra adicionou-se 200µL de solução de hidróxido de sódio 2N, 300µL de uma solução saturada de bicarbonato de sódio e 1,5mL de solução de Cloreto de Dansila 7,5g/L (Dinâmica). Em seguida, colocou-se a mistura em banho de água a 40ºC por 45min, ao abrigo da luz. Após este tempo, adicionou-se 100µL de L-Prolina 100g/L. Após 30min ajustou-se o volume a 5ml com acetonitrila. Submeteu-se a Centrifuga 420R (Hettich, Brasil) 6min, 4ºC e 11000rpm. As soluções foram filtradas por unidade filtrante com membrana de PTFE, 0,45mm, com uso de seringa. Mantidas sob refrigeração até injeção do analito.

Preparação da solução mãe. Histamina $\geq$ 97% $C_5H_9N_3$ (Sigma Aldrich, EUA) de qualidade analítica, foi preparada a concentração de 1g/L em solução de Ácido Clorídrico (HCl) 0,1 mol/L (Dinâmica).

Soluções de trabalho. Foram preparadas a partir da solução mãe de histamina, nas concentrações: 1,0; 5,0; 25; 50; 100 e 150mg/L diluindo-se em solução de HCl 0,1 mol/L (Dinâmica) para volume final de 2mL, com injeções realizadas em triplicata.

Condições cromatográficas. A separação cromatográfica da amina biogênica foi realizada de acordo com os procedimentos da Normativa n.º 25 – MAPA (Brasil, 2001), com modificações. Utilizou-se equipamento HPLC *proeminence*, Software LC *Solution* (Shimadzu, Japão), equipado com um detector UV- Vis PhotoDiode Array Detector (DAD) a 254nm, coluna de fase reversa Shim-Pack VP-ODS (250 x 4.6mm, 12nm, 4,6µm, 100Å), com *loop* de 20µL. As amostras foram eluídas com um gradiente de acordo com a Tabela 1 e fase móvel Acetonitrila / Água, fluxo de 1mL/min, Pressão da Bomba em 50Kgf/cm^2 e temperatura do forno de 40ºC

Tabela 1: Gradiente de Eluição para análise de histamina.

Tempo (min)	Água (%)	Acetonitrila (%)
0.01	40	60
1.00	25	75
2.00	25	75
3.00	5	95
4.00	5	95
5.00	40	60
15.00	40	60

A identificação da histamina foi feita por comparação entre o tempo de retenção do padrão com tempo dos picos das amostras.

Parâmetros de estudo da curva - O método de quantificação de histamina em amostras de SS foi avaliado em termos dos parâmetros analíticos: linearidade, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). A análise das amostras foi realizada em duplicata.

A quantificação da histamina foi realizada através de padronização externa e o valor encontrado na amostra foi multiplicado pelo fator de correção, que foi calculado com base na recuperação do método. Para o cálculo de recuperação (%Rec) pesou duas porções de 1g de matriz branca para histamina, fortificando uma delas (Brasil, 2011) com alíquota de 1mL da solução padrão a 50 mg/L de histamina para atingir uma concentração de 50 mg/Kg (que corresponde ao ponto intermédio da curva de calibração 50 mg/L). Onde o %Rec corresponde a fórmula abaixo, em que C_1 é a concentração da amostra não adicionada; C_2 concentração determinada da amostra adicionada; e C_3 concentração adicionada.

$\%Rec = (C_2 – C_1 / C_3) \times 100$

Para calcular o fator de correção (fc_{rec}) dividindo o conteúdo encontrado pelo conteúdo adicionado multiplicado por 100.

Os limites de quantificação e detecção foram calculados empregando-se o método baseado nos parâmetros da curva analítica.

4.7 Análise Estatística dos Dados

Para resultados de análises microbiológicas, os dados foram submetidos a uma análise de variância ANOVA e classificação de médias foram tratados pelo teste de *Scott-Knott*, no programa ASSISTAT Versão 7.7 beta, ao nível de 5% de probabilidade.

REFERÊNCIAS

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **MC Boas Práticas**: Módulo 2: Gram-negativos: Fermentadores, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/MODULO2/objetivos.htm>. Acesso em: 12.dez 2016.

BADARÓ, A.C.L; AZEREDO, R M C; ALMEIDA, M. E. F de. Vigilância Sanitária de Alimentos: uma Revisão. R**evista Digital de Nutrição**, Ipatinga (MG), v. 1, n.1, p,1 -25, 2007.

BARBER, K.; TAKEMURA, H. **Sushi técnica y sabor.** Barcelona: Blume, 2011. 256 p.

BARBER, K.; TAKEMURA, H. **Sushi: taste and technique.** Porto: Civilização Editores, 2008. 256 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Decreto n.º 1.236, de 02 de setembro de 1994.Dá nova redação ao art. 507 do Decreto n° 30.691, de 29 de março de 1952, que regulamenta a Lei n° 1.283, de 18 de dezembro de 1950. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, DF**, 11.nov. 1976. Disponível em: < http://www2.planalto.gov.br/ >. Acesso em: 10.jan. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado). Diá**rio Oficial [da] República Federativa do Brasil**, DF, 19.maio. 1997. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 10.jan. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, DF**, 19.maio. 1997. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/ >. Acesso em: 10.jan. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC n.º 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, DF**, 10. jan. 2001. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 10.jan. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde**. Sistema nacional de vigilância em saúde**: relatório de situação. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 28p.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (CVE/SP). SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO. **Manual das Doenças Transmitidas por Alimentos**: *Aeromonas Hydrophyla* e outras spp. São Paulo: CVE/SP, 2003. 3p. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/aeromonas.pdf.> Acesso em: 02 maio 2016.

CHAUDHURY, A.; NATH, G.; SHUKLA, B. N.; SANYAL, S. C. Biochemical characterization, enteropathogenicity and antimicrobial resistance plasmids of clinical and environmental *Aeromonas* isolates. **Journal of Medical Microbiology**, [S.l.], London, v. 44, n. 6, p. 434-437, 1996.

CLEMENTS, A; YOUNG, J.C.; CONSTANTINOU, N.; FRANKEL, G. infection stregies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut. Microbes**, v.3, n.2, p.71-87, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). M100-S25: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. **Wayne, PA**: CLSI, 2015.16p.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture 2012. **Rome: FAO**, 2012. 209p.

FDA. Food and Drug Administration. Fish and fishery products hazards and controls guidance. 4 ed. **Washington: Office of Seafood**; Chap. 7. p.113-152, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture** 2012. Rome: FAO, 2012. 209p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 2014. 223p.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Fish and Fisheries Products Hazards and Controls Guide**. Office of Seafood. Washington: FDA, 1996. 244p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora: Atheneu, 2008. 99p.

FREITAS, I.M.S.; SHINOHARA, N.K.S.; SILVA, G.D.; DEMETRIO, A.A.; AGNANI, J.A.T.; SIQUEIRA, L.P. Boas Práticas de Manipulação na Culinária Japonesa.

GERMANO, P. M. I.; MIGUEL, M.; MIGUEL, O.; GERMANO, M. I. S. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, n.7, p.6-11,1993.

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

GLOBO. **Cozinha japonesa**: as mais famosas receitas das nossas avós. Sao Paulo:Editora Globo, 1993.79 p.

GRAM, L.; MELCHIORSEN, J. Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas* spp. and *Shewanella* putrefaciens in fish extracts and on fish tissue. **Journal of Applied Bacteriology,** Londron, v.80, p.589-595, 1996.

_____. **Guidance for the Industry**: Fish and fisheries products hazards and controls guidance. Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2011. p. 402-2300.

_____.**Global *per capita* fish consumption rises above 20 kilograms a year**. Rome: FAO, 2016. Disponível em: <http://www.fao.org/news/story/en/item/421871/icode/>. Acesso em: 25.set 2016.

HALBWACHS, M. **A memória coletiva**. São Paulo: Vértice, 1990. 189p.

HALL RL. **Food-borne illness: implications for the future**. Emerging Infectious Diseases, Georgia, (US), v.3, n.4, p. 555–559, 1997.

HOFFMANN, F.L.; GARCIA-CRUZ, C.H.; VINTURIM, T.M.; FAZIO, M. L. S. Levantamento da qualidade higiênico-sanitária de pescado comercializado na cidade de São José do Rio Preto (São Paulo). **Revista de Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.64, p. 45-48. 1999.

HUNGERFORD, J. M. Scombroid poisoning: A review. **Toxicon.** V.56, p. 231-243. 2010.

HUSS, H.H. **Quality and quality changes in fresh fish**. Rom: Food and Agriculture Organization of United Nations, Fisheries Technical Paper, 1995. 195p.

In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 9,2009, Recife. **Anais...**Recife: UFRPE, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009**: Aquisição alimentar domiciliar *per capita*. Rio de Janeiro: IBGE. 2010.2282p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microrganisms in food. I**: Their significance and methods of enumeration. 2ed. Toronto: University Press, 1988. 436 p.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

KIM, S.H., BEN-GIGIREY, B., BARROS-VELÁZQUEZ, J., PRICE, R.J.; AN, H. Histamine and biogenic amine production by Morganella morganii isolated form temperature-abused albacore. **Journal of Food Protection**, v.63, n.2, p. 244-51, 2001.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple Antibiotic Resistance Indexing of *Escherichia coli* to Identify High-Risk Sources of Fecal Contamination of Foods. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.46, n. 1, p. 165-170, July 1983.

LOHIYA, G-S. LOHIYA, SAPNA, LOHIYA, SUNITA; KRISHNA, V. Scombrotoxinism: Protracted Illness following Misdiagnosis in the Emergency Department, *Case Reports in* **Emergency Medicine**, 2015.

LOPES, I.G.; OLIVEIRA, R.G.; RAMOS. F. M. **Perfil do consumo de peixes pela população brasileira**. Biota Amazônia, Macapá, v. 6, n. 2, p. 62-65, 2016.

MACHADO, T.M.; FURLAN, E.F.; NEIVA, C.R.P.; CASARINI, L.M.; ALEXANDRINO DE PEREZ, A. C.; LEMOS NETO, M.J.; TOMITA, R.Y. Fatores que afetam a qualidade do pescado na pesca artesanal de municípios da costa sul de São Paulo, Brasil. ***Boletim* do *Instituto* de *Pesca***, São Paulo, v.36, n.3, p. 213 – 223, 2010.

MELO, M.V.C; HOLANDA, M.O.; MARTINS, N.M.; RODRIGUES, R. L. Ocorrência de helmintos em sushis e sashimis comercializados em supermercados de Fortaleza - CE. **Revista de Nutrição e Vigilância em Saúde**, Fortaleza, v. 1, n. 3. 2014.

MERCOSUL. Mercado Comum Sulamenricano. Recomendação N° 8/94 AR do Subgrupo de Trabalho n.° 3, "Normas Técnicas". Resolução n.º 40, 1994.

MOTA, R.A.; SILVA, M.F.L; PORTO, W.J.N.; SILVA, L.B.G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição à multirresistência bacteriana. ***Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science***, São Paulo, v.42, n.6, p. 465-470, 2005.

NESPOLO, N.M.; MARTINELI, T.M.; ROSSI JR, O.D. Microbiological Quality Of Salmon (*Salmo Salar*) Sold In Cities Of The State Of São Paulo, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo,. v.43, n.4, p. 1393-1400, 2012.

NGUYEN, Y.; SPERANTO, V. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. **Frontiers in *Cellular* and *Infection Microbiology***, Switzerland, v.2, p.1-7, 2012.

OETTERER, M. **Industrialização do pescado cultivado.** Guaíba: Agropecuária, 2002. 200p.

OKAMOTO, M.; BUCK, C. **A Arte do Sushi**. São Paulo: Editora Melhoramentos2002.71 p;

OLIVEIRA, H. A. C., SILVA, H. C. C., SAMPAIO, A. H., VIANA, F. A., SAKER-SAMPAIO, S. A. Determinação de histamina por cromatografia líquida de alta eficiência de

fase reversa em atum e sardinha enlatados. **Revista Ciência Agronômica**, Vol. 35, Número Especial, out.: 179 – 18, 2004.

OLIVEIRA, P.R.; JESUS, R. S.; BATISTA, G. M.; LESSI, E. Avaliação sensorial, físico-química e microbiológica do pirarucu (*Arapaima gigas*, Schinz 1822) durante estocagem em gelo/Sensorial. **Brazilian Journal of Food Technology**. Campinas, v. 17, n. 1, p. 67-74, 2014.

PEREDA, J.A.O; RODRÍGUEZ, M.I.C.; ÁLVAREZ, L.F.; SANZ, M.L.; MINGUILLÓN, G.D.G.F.; PERALES, L.H.; CORTECERO, M.D.S. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal.** v. 2. Editora Artmed. São Paulo. 2005. 279p.

PEREIRA, K.C. Estudo Tecnológico de Conservação e Processamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*).1997. 64f. **Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)** - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis,1997.

PEREIRA, K.C. **Estudo Tecnológico de Conservação e Processamento de tilápia** (*Oreochromis niloticus*).1997. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis,1997.

PORTAL BRASIL. Consumo de Pescado no Brasil aumenta 23,7% em dois anos. Publicado: 17 out. 2013. Última modificação: 30 julho 2014. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2013/10/consumo-de-pescado-no-brasil-aumenta-23-7-em-dois-anos>. Acesso em: 23 ago. 2015.

PORTO ALEGRE. Secretaria Municipal de Saúde - SMS. Portaria nº 1109 de 23 de agosto de 2016. Aprova as exigências mínimas para produção, preparo e comercialização de sushis e sashimis no Munícipio de Porto Alegre. **Diário Oficial do Estado de Rio Grande do Sul,** 24. Ago. 2016. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=327789>. Acesso em: 24. Set. 2016

PUTHUCHEARY, S.D.; PUAH, S.M.; CHUA, K.H. Molecular characterization of clinical isolates of *Aeromonas* species from Malaysia. **PLoS One**. San Francisco, v.7, n.2, p.1-7, 2012.

RAWDKUEN, S.; SUTHULUK, P.; KAMHANGWONG, D.; BENJAKUL, S. Mechanical, Physico-Chemical, and Antimicrobial Properties of Gelatin-Based Film Incorporated with Catechin-Lysozyme. **Chemistry Central Journal**, v.6, n. 131, p1-10, 2012.

RIBEIRO, C.**A influência da gastronomia Nipo-Brasileira na cidade de São Paulo**. São Paulo: UNIP, 2007. 68p. (Coletânea de artigos dos alunos de gastronomia da Universidade Paulista).

RIBEIRO, C.M.A.; PAOLUCCI, L. **Gastronomia, Interação cultural e Turismo: estudo sobre a dispersão da culinária nipônica na Cidade de São Paulo – 100 anos da imigração japonesa no Brasil**. 2006. 69 f. Dissertação (Mestrado em Turismo) – Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, 2006.

RODRIGUES, B.L.; SANTOS, L.R.; MÁRSICO, E.T.; CAMARINHA, C.C.; MANO, S. B.; CONTE, C.A.J. 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, Londrina, v. 33, n. 5, p. 1847-1854, set/out. 2012.

SANATH-KUMAR, S.H., SUNIL, R., VENUGOPAL, M.N., KARUNASAGAR, I. Detection of *Salmonella* spp. in tropical seafood by polymerase chain reaction. **International Journal of Food Microbiology**, Roma, n. 88, p.91–95, 2003.

SANTOS, A.A.; SIMÕES, T.N.; CRUZI, M.M.; FERREIRA, N.S.S.; LIMA, R.T.C.; TUNON, G.I.L. Avaliação da qualidade microbiológica de *sushi* comercializado em restaurantes de Aracaju, Sergipe. **Scientia plena**, v.8, n.3, 2012.

SANTOS, C.R.A. A alimentação e seu lugar na história: os tempos da memória gustativa. **Revista da academia Paranaense de Letras**, Curitiba, n. 51, p. 165-188, 2005.

SCHERR, C.; GAGLIARDI, A.C.M.; MINAME, M.H.; SANTOS, R.D. Concentração de Ácidos Graxos e Colesterol de Peixes Habitualmente Consumidos no Brasil. **Arquivos Brasileiros de *Cardiologia***, *São Paulo, v.*104, n.2, p.152-158, 2015.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE. **Aquicultura no Brasil: série de estudos mercadológicos**. Brasília: SEBRAE, 2015.76p.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação**. 7. ed. São Paulo: Varela, 2014. 694p.

SILVA, A.B.; SOARES, A.L.R.; WOLF, R.A. **Dossiê "Jornadas Mercosul: Memória, Ambiente Patrimônio (2010) " - Registro da gastronomia japonesa como patrimônio imaterial dos nikkeis residentes no Brasil.** Mouseion, Centro Canoas (RS), n.10, p. 150 – 157, 2011.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A. SILVEIRA, N.F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001.107p.

SILVA, P. L. Patógenos que comprometem a qualidade dos alimentos. **Feed & Food – segurança alimentar para a saúde e bem-estar do homem**, Porto Feliz, v.1, n.4, p.50-54, 2006.

SOARES, A.L.R; GAUDIOSO, T. K. Entre o sushi e o churrasco: Gastronomia, culinária e identidade étnica entre imigrantes japoneses. **Habitus,** Goiânia, v.11, n.1, p. 77-94, jan/jun, 2013.

SOARES, K.M.P.; GONÇALVES, A.A. Qualidade e segurança do pescado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, n.1, p.1-10, 2012.

TAKAHASHI, H., OGAI, M., MIYA, S., KUDA, T., KIMURA, B. Effects of environmental factors on histamine prouction in the psychrophilic histamine-producing bacterium Phhotobacterium iliopiscarium**. Food Control**, v.52, p. 39-42. 2015.

_____. **The State of World Fisheries and Aquaculture**: Contributing to food security and nutrition for all. Rome: FAO, 2016. 200p.

VALLANDRO, M.J. **Avaliação da qualidade microbiológica de sashimis a base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa na cidade de Porto Alegre- RS**.2010.69f. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2010.

VELLOSO, E.A. **Avaliação sensorial e físico-química de filés de tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*) refrigerados e submetidos à radiação gama**. 2004. 68f. (Monografia em Especialização em Irradiação de Alimentos) - Universidade Federal Fluminense, Niterói,2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Animal Waste, Water Quality and Human Health**. London: WHO/ IWA, 2012. 489p.

CAPÍTULO II

Artigo segundo as normas da Revista de Saúde Publica

Título:

Micro-organismos indicadores e patogênicos em amostras de *sashimi* de salmão (*Salmo salar*)

Indicator and pathogenic microorganisms in samples of salmon sashimi (*Salmo salar*)

Título resumido:

Micro-organismos em amostras de *sashimi* de salmão

Autores:

Cordeiro, Karina Silva[1]
Lygia Silva Galeno[1]
Carvalho, Isabel Azevedo[1]
Costa, Francisca Neide[1, 2]

[1] **Endereço:** Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água – Universidade Estadual do Maranhão - Cidade Universitária Paulo VI - s/n - Tiririca - CEP. 65055-310 - São Luís/MA, Brasil.

[2] **Autor correspondente** – Francisca Neide Costa – Endereço: Rua Juritis qua,07 Ed. Mirela apto 705, Renascença II, 65.055-970.

Financiamento:

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Maranhão (FAPEMA), Edital n.º 40 /2015.

Dissertação – Universidade Estadual do Maranhão – Ano de defesa: 2017.

Resumo:

OBJETIVO: Determinar e identificar micro-organismos indicadores e patogênicos, visando contribuir para o conhecimento da microbiota e evidenciar necessidades de controle sanitários dos alimentos.
MÉTODOS: As amostras de *sashimi* de salmão (*Salmo salar*) foram coletadas de 10 restaurantes especializados, no município de São Luís–MA, onde em cada restaurante foram coletadas seis amostras, perfazendo um total de 60 amostras. No Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da UEMA, as amostras foram analisadas quanto a: contagem de coliformes a 35ºC e a 45ºC, contagem de *Staphylococcus aureus*, identificação de *Escherichia coli, Aeromonas* spp.*, Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella* sp. Resultados foram avaliados estatisticamente utilizando o teste *Skott Knott*.
RESULTADOS: Foram verificadas a ausência de *Vibrio parahaemolyticus* em 100% das amostras testadas; presença de *Salmonella* sp. em 3 (5%) das amostras; coliformes a 35ºC de 0,4x10 a ≥ 2,4x10^2NMP/g, coliformes a 45ºC variaram de 0 a $\geq$ 2,4x10^2 NMP/g com 20% (12) > 10^2 NMP/g, destes foram identificados cepas de *E. coli* em 3 (5%) das amostras; quanto aos *Staphylococcus aureus* apresentaram contagem de <20 a 5,0x10^4 UFC/g, e nenhuma das amostras apresentou *S.* coagulase positiva; *Aeromonas* spp. foram identificadas em 95% das amostras, destas 60 (91%) foram identificadas como *A. hydrophila* e 6 (9%) *A. caviae.*
CONCLUSÃO: As amostras analisadas apresentam condições higiênicos-sanitárias insatisfatórias e risco a saúde pública.
Descritores: Patógeno Biológico; Microbiologia de alimentos; Doenças Transmitidas por Alimentos

Abstract:
OBJETIVE: To determine and identify microorganisms that are indicative and pathogenic, aiming at contributing to the knowledge of the microbiota and evidencing the needs of sanitary control of food.

METHODS: Samples of salmon sashimi (*Salmo salar*) were collected from 10 specialized restaurants in the of city. Where six samples were collected in each restaurant, for a total of 60 samples. In the Laboratory of Microbiology of Food and Water of the UEMA, the samples were analyzed for: counting of coliforms at 35ºC and 45ºC, *Staphylococcus aureus* count, identification of *Escherichia coli*, *Aeromonas* spp., *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella* sp. Results were statistically evaluated using the Skott Knott test.
RESULTS: The absence of Vibrio parahaemolyticus in 100% of the samples tested was verified; Presence of *Salmonella* sp. In 3(5%) of the samples; coliforms at 35°C from 0.4x10 to ≥2.4x10 ^{2} NMP/g, coliforms at 45°C ranged from 0 to> 2.4x10^{2} NMP/g with 20% (12) >10^{2} NMP/g, of which strains of *E. coli* in 3 (5%) of the samples; *Staphylococcus aureus* showed a count of <20 to 5.0x10^{4} CFU/g, and none of the samples had *S*. coagulase positive; *Aeromonas* spp. Were identified in 95% of the samples, of which 60 (91%) were identified as *A. hydrophila* and 6 (9%) *A. caviae*.
CONCLUSION: The analyzed samples present unsatisfactory hygienic-sanitary conditions and public health risk.
Descriptors: Noxae; Food Microbiology; Foodborne Diseases

Resumen:

OBJETIVO: Determinar e identificar microorganismos patógenos e indicadores, para contribuir al conocimiento de la microbiota y la evidencia de control sanitario necesita alimento.
MÉTODOS: Se analizaron muestras de sashimi de salmón (*Salmo salar*) se obtuvieron de 10 restaurantes especializados en São Luís - MA, en donde en cada restaurante se recogieron seis muestras, con un total de 60 muestras. En Laboratorio de Microbiología de Alimentos y agua - UEMA, se analizaron muestras para: coliformes en 35ºC y 45ºC, *Staphylococcus aureus* cuentan, identificación de *Escherichia coli, Aeromonas*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Salmonella* sp. Los resultados fueron evaluados estadísticamente mediante la prueba de Skott Knott.
RESULTADOS: la ausencia de Vibrio parahaemolyticus en el 100% de las muestras analizadas fueron controlados; presencia de *Salmonella* sp. 3 (5%) de las muestras; coliformes a 35°C de 0,4x10 a ≥ 2,4x10^{2} NMP/g coliformes a 45°C que van de 0 a> 2,4x10^{2} NMP/g con 20% (12)> 10^{2} NMP/g, se identificaron estas cepas *E. coli* 3 (5%) de las muestras; *Staphylococcus aureus* como el presente contador <20 a 5,0x10^{4} CFU/g, y ninguna de las muestras mostró *S*. coagulasa positiva; *Aeromonas* spp. se identificaron en 95% de las muestras de estos 60 (91%) fueron identificados como *A. hydrophila* y 6 (9%) A. caviae.
CONCLUSIÓN: Las muestras analizadas tienen las condiciones higiénicas y sanitarias y los riesgos para la salud pública insatisfactoria.
Descriptores: Noxas; Microbiología de Alimentos; Enfermedades Transmitidas por los Alimentos

Agradecimentos: À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Maranhão (FAPEMA), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Universidade Estadual do Maranhão (UEMA).

Introdução

O crescente surgimento de lojas especializadas na culinária japonesa, comuns aos bairros de classes elevadas e nas metrópoles, é evidenciado pelo número de lojas presentes em shoppings, dentro da categoria de *fast-food*, e lojas na modalidade de entregas em domicílio "*delivery*"[51], e constitui fomento ao aumento no consumo de peixes no país e aquecimento da indústria do pescado, sobretudo aquicultura, que nas últimas décadas (1980-2010) se expandiu mundialmente com taxa de crescimento anual de 8,8%. O consumo mundial *per capita* de peixe aparentemente deverá atingir 19,6 Kg em 2021, 16% maior do que a média para 2009-2011[16].

No *post-mortem* e no armazenamento, a temperaturas próximas a 0ºC, as bactérias penetram a musculatura e inicia-se a proliferação de bactérias psicrófilas deteriorantes do pescado[38]. A microbiota presente no pescado reflete o seu ambiente de extração e o modo de captura, sendo a temperatura um fator seletivo[19,21]. Peixes de água morna apresentam, em sua maioria, bactérias mesófilas gram-positivas; peixes de água fria apresentam principalmente bactérias gram-negativas[26]. A deterioração do pescado acontece especialmente devido à presença de bastonetes gram-negativos não esporulados pertencentes aos gêneros: *Pseudomonas, Actinobacter, Moraxella* e *Flavobacterium*[52].

Outras bactérias encontradas são os coliformes, *Clostridium* sp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Vibrio,* originadas do ambiente, processamento e/ou armazenamento incorretos, contaminação cruzada e contaminação por manipulação [24]. A análise de *Salmonella* spp., mesófilos e coliformes é utilizada para avaliação da qualidade dos produtos, assim como *Staphylococcus aureus* que produz enterotoxinas, resistentes à cocção, associadas a intoxicação alimentar[44]. O peixe fresco ou resfriado é prioritariamente deteriorado por bactérias, assim como os fungos são os principais deterioradores de peixes salgados e secos[26].

A estatística dos sistemas de vigilância mostra aumento o número de casos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em todo o mundo, independentemente da composição racial, grau de desenvolvimento, condição socioeconômica e cultural da população[49]. Muitas pessoas são acometidas e nem sempre há causa evidente.

O pescado é classificado como alimento de alto risco por ser um potencial veículo de micro-organismos patogênicos causadores de DTA. As DTA, são agravos à saúde resultantes do consumo de alimentos contaminados por patógenos, por substâncias químicas, objetos lesivos ou constituídos com estrutura naturalmente tóxica[43].

A ANVISA, através da Resolução n.º 12/01, regulamenta padrões microbiológicos para alimentos e estabelece a tolerância de micro-organismos de interesse para amostra indicativa, respectivamente: coliformes a 45ºC <10^2 NMP/g; *Staphylococcus* coagulase positiva < 5x10^3UFC/g; *Vibrio parahaemolyticus* (específico para produtos à base de pescados) < 10^3UFC/g e *Salmonella* sp. ausência em 25g - para pratos prontos para o consumo – a base de carnes, pescados e similares crus: quibe cru, *carpaccio*, *sushi*, *sashimi*, etc[10].

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de determinar o Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35ºC e a 45ºC, contagem e identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa, identificação de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Aeromonas* spp. e *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de *sashimi* de salmão (*Salmo salar*), visando contribuir para o conhecimento da microbiota e evidenciar necessidades de controle sanitários dos alimentos.

Métodos

Foram obtidas 60 amostras de *sashimi* de salmão coletadas de restaurantes, localizados no munícipio de São Luís – MA. Os restaurantes foram identificados a partir de listagem emitida pela Secretaria Municipal de Saúde – Coordenação de Vigilância Sanitária, destes foram selecionados 10 restaurantes especializados em culinária japonesa, de acordo com a disponibilidade do produto *sashimi*. Identificados como: R1 a R10. O ensaio foi conduzido em arranjo fatorial 10x6 (dez estabelecimentos x seis períodos de amostragem).

Os métodos utilizados foram da *American Public Health Association* (APHA) e descrita *no Compendium of Methods for de Microbiological Examination of Foods*[50].

Para contagem de coliformes a 35ºC e a 45ºC foram utilizados tubos múltiplos de caldo verde brilhante e tubos com caldo *Escherichia coli* (EC), respectivamente. A partir dos tubos de caldo EC com crescimento semeou-se em ágar Eosina Azul de Metileno incubou-se a 35ºC/24h, as colônias típicas foram submetidas a coloração de Gram e teste INViC (Indol, Vermelho de metila, *Voges-Proskauer* e Citrato).

Para isolamento de *Salmonella* sp. realizou-se enriquecimento em caldos Rappaport-Vassiliadis e Selenito Cistina. A partir dos tubos com crescimento, semeou-se em ágar Entérico de Hektoen e ágar Xilose Lisina Desoxicolato para plaqueamento seletivo, incubou-se a 35°C/24h, as colônias típicas foram submetidas a provas bioquímicas e sorológica.

No isolamento de *Aeromonas* spp. realizou-se crescimento em caldo Tripticase Soja e incubou-se a 28°C/24h. Destes foram semeadas alíquotas para crescimento em ágar Vermelho de Fenol-amido-ampicilina[29,39] e ágar Dextrina-ampicilina [22], adicionadas de ampicilina (10mg/L) e incubadas a 28°C/24h. as colônias positivas foram submetidas aos testes oxidase e catalase, as cepas positivas nos dois testes foram consideradas como Aeromonas sp. e submetidas às provas bioquímicas para a identificação das espécies (*A.schubertii*, *A. caviae*, *A. trota*, *A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. veronii biovar veronii*), segundo a chave de identificação Aerokey II[12].

A idenficação e contagem de *Staphylococcus* foi realizada utilizando-se placas contendo ágar Baird-Parker, adicionado de telurito de potássio e emulsão de gema de ovo, distribuído com auxílio de alça de Drigalsky, e as mesmas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C/48h. Após este período, realizou-se a contagem do número de colônias que apresentavam características típicas do gênero e a contagem das colônias atípicas. As colônias típicas de *Staphylococcus* foram submetidas a coloração de Gram e aos testes de catalase e coagulase, sendo considerado resultado positivo quando houve a formação de grumos e coagulação, respectivamente[44].

A pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* foi realizada com uso de 25g de amostra de *sashimi* de salmão em água peptonada 3%NaCL, seguindo as diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4}, das que apresentaram crescimento, coletou-se a película superficial formada de cada tubo, e semeou-se em placas de ágar tiossulfato-citrato-bile-sacarose (TCBS) e incubadas 37°C/24h. Foram selecionadas 3 a 4 colônias típicas sacarose negativa de *V. parahaemolyticus.* Seguiu-se coloração de Gram para identificação de morfologia e provas bioquímicas para *V. parahaemolyticus*[44].

Para Análise Estatística dos Dados, para resultados de análises microbiológicas de coliformes e *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa, os resultados foram submetidos a uma análise de variância ANOVA e classificação de médias tratadas pelo teste de *Scott-Knott*, programa ASSISTAT Versão 7.7 e 5% de probabilidade.

Resultados

Todas as amostras analisadas apresentaram contaminação por coliformes a 35ºC, com variação de 0,4x10 a ≥ 2,4x10^2NMP/g, apresentando valores >10^2NMP/g em 65% (39) das mesmas, conforme Tabela 1. As médias de contagem apresentam-se >10^2NMP/g e não houve diferença estatística significativa entre as mesmas.

Para contaminação por coliformes a 45ºC observou-se variação de 0 a $\geq$ 2,4x10^2 NMP/g, conforme dados apresentados na Tabela 2, destas amostras, 20% (12) apresentaram valores >10^2NMP/g, configurando produtos em condições sanitárias insatisfatórias, de acordo com a RDC n.º 12/01- ANVISA [10]. As médias de resultados entre os locais de coleta não diferiram estatisticamente entre si.

Em 5% (3) das amostras foi identificada a bactéria *E. coli*, com contagens de coliformes a 45ºC de $\geq$2,4x10^2NMP/g, 0,1x10NMP/g e 0,2x10NMP/g, respectivamente. Dentre estas, duas amostras provenientes do restaurante R6.

A população encontrada de *Staphylococcus* variou de <20 a 5,0x10^4UFC/g, e nenhuma das amostras analisadas apresentou *Staphylococcus* coagulase positiva. Sendo, 22% (13) das amostras com contagem $\geq$ 5,0x10^3 UFC/g e 45% (27) com contagem <20 de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN). Não houve diferença estatística significativa entre as médias de resultados, conforme Tabela 3.

Aeromonas spp. foram identificadas em 95% (57) das amostras analisadas. Sendo, 91% (60) *A. hydrophila* e 9% (6) *A. caviae,* conforme Tabela 4.

Foi identificada a presença de *Salmonella* sp. em 5% (3) das amostras, caracterizando-as como impróprias ao consumo humano[10].

Não foram identificadas colônias sugestivas de *Vibrio parahaemolyticus* nas amostras de *sashimi* de salmão.

Discussão

A presença de micro-organismos do grupo coliformes em alimentos indica possível contaminação por fezes humana ou animal. Micro-organismos patogênicos e deteriorantes em alimentos são consequentes de falha nos controles de produção e/ou recontaminação, procedimento de higienização e sanitização de utensílios e equipamentos não conformes e armazenamento inapropriado[17].

Em estudo realizado com amostras de *sushi*, Mouta et al.[33] encontrou resultados coliformes a 35ºC que variaram de 0,1x10 a 5,4x10^2 NMP/g. Montanari et al.[32], em amostras de *sashimi* de salmão, verificaram que dentre os três restaurantes estudados apenas um apresentou amostras aptas ao consumo humano. Sugerindo, baixos níveis de higiene, más condições de armazenamento e processamento, e escolha de fornecedores com ineficaz padrão de higiene.

A preparação *sashimi* é uma iguaria predominantemente manipulada com as mãos e utensílios de corte, sendo muitas vezes utilizado pano multiuso tipo *perfex*® para a

secagem do filé, a ser consumido cru. Observou-se, que os cortes do filé são realizados no momento de servir a preparação, sendo que a peça permanece em vitrine refrigerada. Entretanto, no momento da compra das amostras não foi possível verificar termômetro ou procedimento de controle de temperatura, sendo definido pela legislação[7] a manutenção de temperatura até 5ºC para preparações prontas para o consumo como pescados crus e a temperatura dos alimentos perecíveis expostos ao consumo deve ser aferida e registrada de 2 em 2 horas.

Não foi visualizada higienização ou troca do pano multiuso, a cada uso, como, secagem de tábua de corte, utensílio de corte e filé de salmão. Tão pouco a realização de higienização de mãos. Esses procedimentos são obrigatórios pela legislação vigente no Brasil, dessa forma a contaminação dos alimentos através do contato com utensílios e mãos contaminadas pode implicar na elevada contagem de NMP/g de coliformes encontrado nas amostras de *sashimi* de salmão.

No produto, *sashimi* de salmão, pronto para consumo e comprado no serviço *delivery*, não foi visualizada identificação de orientação na embalagem do mesmo, assim como informações sobre tempo de consumo e conservação do mesmo, portanto, uma falha constante e realizada por todos os restaurantes, cujas amostras foram analisadas neste estudo. Sendo a identificação via rótulo/embalagem, uma medida preconizada pela legislação brasileira. Dessa forma a ausência de informações como, nome da preparação e data de validade, podem induzir a troca, reutilização de embalagem e, portanto, contaminação cruzada, assim como a demora de consumo do produto e aumento da carga microbiana por acondicionamento incorreto.

Medidas, como a utilização de rótulo e identificação de fabricação e recomendações de uso, são necessárias para a prevenção de contaminação dos alimentos e contenção da proliferação de micro-organismos. Sendo os coliformes um grupo de micro-organismos, cuja presença indica falta de higiene na manipulação dos alimentos, contaminação ambiental e deficiência na execução de boas práticas. Portanto, mecanismos e procedimentos devem ser prioritariamente instituídos, documentados, praticados e supervisionados por profissional habilitado e responsabilidade técnica. Segundo Brasil[9], restaurantes comerciais devem dispor de um profissional nutricionista por até 5000 porções/dia.

A presença da bactéria patogênica *E. coli*, mesmo com baixas contagens de coliformes a 45ºC, sugere a contaminação deste alimento via manipulador, pela

possibilidade de albergar a mesma em seu trato gastrintestinal e higiene pessoal deficitária, e ainda a contaminação cruzada, através de bancadas e utensílios sob higiene não conforme. Por isso, é de extrema importância o treinamento de manipuladores de alimentos, assim como reciclagem dos mesmos, enfatizando a aplicação correta de boas práticas de manipulação de alimentos.

O padrão microbiológico de alimentos crus prontos para o consumo, não especifica a necessidade de identificação ou contagem de *E. coli* que inviabilize o consumo do alimento[10]. O que implica na possibilidade de amostras desses alimentos serem consideradas como própria ao consumo humano, mesmo com a identificação de bactérias *E. coli*. e baixa contagem de coliformes a 45ºC, como no caso duas amostras analisadas nesta pesquisa.

A *E. coli*, micro-organismo comprovadamente enteropatogênico, que faz parte dos coliformes termotolerantes, são habituais nas fezes de animais de sangue quente, a exemplo o homem. Sua presença em alimentos indica possível contaminação por resíduo fecal ou esgoto[44]. Segundo Evangelista-Barreto[15], a contaminação por utensílios e equipamentos mal higienizados e as mãos do manipulador são responsáveis diretos pela contaminação microbiana dos alimentos em seu preparo.

No momento de compra das amostras de *sashimi* de salmão, não foi possível a identificação de termômetros no equipamento tipo estufa refrigerada, tão pouco procedimento de controle de temperatura do equipamento por parte de funcionários. Considerando que a etapa de conservação dos alimentos crus, prontos ao consumo humano, deve ser a baixas temperaturas ($\leq$5ºC), a proliferação de micro-organismos presentes nestes alimentos pode facilmente acontecer, principalmente a multiplicação de bactérias mesófilas, como o caso dos coliformes e *E. coli*.

Em Nevada – Estados Unidos, após surto de doença de origem alimentar, ocorrida em restaurante de *sushi*, Jain et al.[25] relataram a identificação da bactéria *E. coli* enterotoxigênica em amostras de fezes de seis de sete doentes e dois de 27 funcionários do restaurante. A presença da bactéria foi determinada como sendo devida a más práticas alimentares de manipulação e má higiene.

Em amostras de salmão (16 resfriadas e 15 congeladas), foi avaliada população de coliformes a 35ºC e a 45ºC, definindo 80,64% das amostras como de boa qualidade higiênico-sanitária. E confirmou, estatisticamente, que congelamento é o melhor procedimento de conservação do produto, no que se refere a coliformes a 35ºC[36].

Evidenciando a influência do método de conservação aplicado sobre os micro-organismos e conservação da matéria-prima.

Em amostras de salmão cru, Liang et al.[28], não encontraram diferença significativa na contagem de micro-organismos aeróbicos - indicador de qualidade microbiológica - proveniente de 19 distritos de Hong Kong. Identificou a presença de *E. coli* em 5% das amostras, semelhantemente aos resultados encontrados na presente pesquisa.

A contagem de *Staphylococcus* é definida como limítrofe para valores $<5,0x10^3$UFC/g, apenas para coagulase positiva[10], a identificação de SCN em alimentos, pode sugerir contaminação via manipulador. Pois, são bactérias normalmente presentes na pele e mucosa humana, desse modo, podem ser facilmente transferidos para alimentos por manipuladores e contaminação cruzada.

Raramente os SCN causam doenças em hospedeiros sadios, mas são considerados micro-organismos oportunistas, pois em algumas situações podem produzir infecções graves, como no caso de hospedeiros imunologicamente imaturos ou comprometidos[30], como crianças, idosos e imunocomprometidos, sendo de elevada importância a produção de alimentos isentos ou com baixa carga destes micro-organismos, com vista a produção de alimentos seguros.

A importância da pesquisa de *Staphylococcus aureus* em alimentos prontos para consumo denota a necessidade de confirmação do agente causador de intoxicação alimentar, com a indicação de contaminação via manipulador, multiplicação do micro-organismo em alimentos armazenados com produção de enterotoxina estafilocócica e exposição do alimento a temperatura inadequada[50].

Nespolo et al.[36] em estudo semelhante encontraram contagens aproximadas, porém identificaram *S. aureus* coagulase positiva em uma amostra. Liang et al.[28], também não encontraram diferença significativa entre as médias de contagem em 19 distritos de Hong Kong, para *S. aureus* em amostras de salmão cru sob sushi. E assim como na presente pesquisa, as amostras foram consideradas próprias ao consumo, devido à ausência de *Staphylococcus* coagulase positiva.

É de extrema importância a utilização de boas práticas de manipulação que inviabilizem a contaminação dos alimentos por *S. aureus* originários de humanos[37]. Igualmente a manutenção do alimento a baixas temperaturas deve ser priorizada para que seja possível a prevenção ou minimização do crescimento microbiano.

Muscolino et al. [34], analisou 38 amostras de *sushi* e 12 de *sashimi* coletadas de restaurantes, *sushi*bar e *take-away outlets* de Messina e Catania na Itália, isolando

S. aureus coagulase positivos em 16 amostras (42,11%) com valores 2,0 a 3,6 log UFC/g. E concluiu que a manutenção da cadeia à frio durante preparação e armazenamento também são essenciais para obtenção de produtos em bom estado microbiológico, assim como Nespolo et al.[36]. Considerando que temperaturas de 10 a 45ºC são favoráveis a produção de enterotoxinas estafilocócicas[13].

Sumner; Ross[47] em avaliação dos riscos de doenças alimentares através de frutos do mar/preparações, identificaram a presença de parasitas em *sushi* e *sashimi*; e baixos níveis de contaminação por micro-organismos. Foram detectados *Staphylococcus* spp., membros da família Enterobacteriaceae, *E. coli*, *Pseudomonas* spp., e *Bacillus cereus*, associados a deficiência de higiene nos restaurantes.

A presença de *Staphylococcus* sp. nas amostras analisadas sugere intensa manipulação a que este alimento é submetido, haja vista o preparo do *sushi* e *sashimi* é realizado com as mãos e falha nos procedimentos de higiene pessoal. Entretanto, isso pode ser evitado por meio do conhecimento e aplicação de boas práticas de higiene pessoal e manipulação dos alimentos. Segundo Freitas et al.[18], a saúde do manipulador é necessária para garantir a produção de alimentos seguros.

Medidas de controle devem ser adotadas por restaurantes de culinária japonesa, com inspeções que visem garantir as boas práticas de manipulação dos alimentos como, higiene das mãos e uso de luvas descartáveis durante o processamento de alimentos[13]. Os manipuladores que apresentarem lesões e ou enfermidades que possam comprometer a segurança dos alimentos devem ser afastados da atividade de preparação de alimentos enquanto persistirem os sintomas[8].

Não há parâmetros de pesquisa de *Aeromonas* para produtos crus prontos ao consumo humano[10]. No entanto, sua presença pode estar diretamente relacionada ao ambiente aquático de origem, sendo os pescados muito susceptíveis a essa contaminação, e ainda, a manutenção de células viáveis no pescado, devido as *Aeromonas* apresentarem crescimento a temperaturas que variam de 5 a 45ºC; como *A. hydrophila, A. caviae* e *A. sóbria,* que são mesófilas e patogênicas, e como *A. salmonicida* e *A. media*, que são psicrófilas e, portanto, podem se manter viáveis no alimento durante o de armazenamento sob refrigeração [45].

Nespolo et al.[36], quantificaram *Aeromonas* em 11 amostras de salmão sob refrigeração, 72,7%(8) das amostras apresentaram população $>10^3$ UFC/g, e identificaram como altas populações que possam gerar perigo a saúde de humanos, principalmente por ingestão do produto em estado natural, hábito crescente de

consumo no Brasil e não quantificaram este micro-organismo nas amostras congeladas.

A *Aeromonas* sp. são comuns a diversos ambientes e são patogênicas em animais de sangue frio, como os peixes. São encontradas em água doce, rios, valas e lagos de água, esgoto bruto, esgoto tratado, lama e água potável tratada com cloro. Sendo comumente isoladas de águas estuarinas e de praias, e podem estar presentes em água de salinidade muito elevada[11,14].

Vale ressaltar que algumas espécies de *Aeromonas* spp. toleram concentrações de cloro utilizadas em água para consumo humano, dessa forma, a contaminação do *sashimi* por *Aeromonas* spp. pode ter ocorrido no seu processamento, em contato com água contaminada, conforme destaca Ghenghesh[20]. Portanto, a água pode ser considerada veículo de contaminação de alimentos, por estes micro-organismos.

Segundo Peixoto et al.[40], *A. hydrophila* está entre as cinco espécies de relevância clínica por serem agentes patogênicos tanto para peixes como para os seres humanos, devido à sua capacidade de produzir exotoxinas a temperaturas de refrigeração. Para Abdullah et al.[1] esse micro-organismo pode causar gastroenterites e infecções de pele em humanos, transmitido pelo contato, consumo de carne e água contaminadas, principalmente em imunocomprometidos.

A. caviae é a espécie de *Aeromonas* mais isolada em fezes diarreicas de crianças, e embora de alta prevalência, os fatores de virulência e os mecanismos de patogenicidade dessa espécie não sejam totalmente estabelecidos[35]. *A. hydrophila* já foi isolada no homem em casos de gastrenterites, infecções do trato urinário, osteomielite, septicemia, meningite e infecções de feridas comuns. Espécies de *Aeromonas* são relatadas como causa de gastrenterites em crianças e adultos e cada vez mais se isolam de pacientes com diarreia do viajante[6,11,46].

O elevado percentual de amostras contaminadas (95%) por *Aeromonas* spp. Neste estudo vão de encontro a necessidade de inclusão de análise deste micro-organismo em pescados, como padrão microbiológico, através de legislação especificam principalmente os consumidos crus, corroborando com os achados de Ullmann et al.[48] e Herrera et al.[23], que avaliaram peixes comercializados na Itália e Espanha, respectivamente. Consideraram que *Aeromonas* spp., isoladas de humanos e animais, têm sido descritos como patógenos emergentes, enfatizando a necessidade de pesquisa em pescado e avaliação de seus riscos à Saúde Pública.

A presença de cepas de *Salmonella* sp. nas amostras de *sashimi* de salmão evidenciam a deficiência na execução de procedimentos de higiene pessoal dos manipuladores, higiene ambiental e controle na conservação e manipulação destes alimentos, evidenciando a necessidade de treinamento e conscientização de manipuladores e funcionários dos estabelecimentos que oferecem o filé de salmão cru, sob preparações da culinária japonesa. Segundo Liang et al[28], bactérias do gênero *Salmonella* são patogênicas, cuja infecção pode ser estabelecida por apenas 10 organismos viáveis. Dessa forma, alimentos contaminados por este micro-organismo representam potencial risco de surtos de DTA.

Lee et al.[27] em busca da determinação das tendências para segurança de alimentos oriundos de restaurantes de culinária estrangeira, examinaram surtos de DTA, de 2001 a 2009, em uma Base de Dados CDC - 2011. Identificaram a ocorrência de 298 surtos associados a alimentos oriundos de restaurantes de culinária japonesa, com etiologia confirmada para: *S.* enteritis (211), norovírus (72), *Campylobacter* (4), *S. aureus* (2), *B. cereus* (2) e outras bactérias (5). A maioria dos surtos foi associada a *Salmonella,* o que pode indicar a elevada patogenicidade deste micro-organismo enfatiza a adoção de medidas preventivas de contaminação de alimentos, independentemente do número de cepas presentes.

A não detecção de *Vibrio parahaemolyticus* nas amostras de *sashimi* de salmão pode ser devida a diversos fatores, considerando que este micro-organismo é amplamente distribuído no ambiente marinho[3], tais como: relativa fragilidade, por sua sensibilidade ao calor e desidratação, e principalmente por sua reconhecida sensibilidade ao frio[17] não resistindo a temperaturas de congelamento. Portanto, sugere-se este como um dos fatores que influenciaram na não detecção de células viáveis deste micro-organismo nas amostras de *sashimi* de salmão, que em sua maioria são armazenados sob congelamento.

Outra possibilidade seria a análise de um número ainda maior de amostras para detecção desse micro-organismo pelos métodos convencionais da microbiologia, além da utilização de procedimentos que possam detecção também células inviáveis, como o uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção de fragmentos de DNA do micro-organismo, possivelmente presentes no alimento, haja vista a sobrevivência de micro-organismos ser relativa a fatores ambientais.

Considerando-se que o meio ágar TCBS é específico para a identificação de *Vibrio* sp. sugere-se o apontamento de outras espécies de *Vibrio*, devido a observação do

crescimento de colônias no referido ágar. Bactérias *Vibrio* sp. apresentam 38 espécies, destas 10 são consideradas patogênicas para humanos, sendo causa de gastroenterites nos países asiáticos, através de peixes e água contaminados[3].

Miguéis et al[31], em análise de amostras de *sashimi* coletadas em Portugal, dentre outros micro-organismos buscou a detecção de *Vibrio* spp., verificou apenas a presença de espécies não-patogênicas, como, *V. pelagius I, V. proteolyticus, V. mimicus e V. corarilliilyticus,* e sugeriu que a presença destes pode indicar a ocorrência de cepas patogênicas.

Em relação surtos de origem alimentar causados por *sushi/sashimi*, uma preocupação é a contaminação cruzada e transferência de patógenos, tais como *Salmonella, Vibrio, Listeria* e *E. coli*, para os peixes, e então, resultar em contaminação das preparações[5]. Adams et al.[2] examinaram a qualidade microbiológica de *sushi* de salmão em 14 restaurantes, em Seattle – Washington, encontraram contaminação por *S. aureus* e *B. cereus* e larvas de anisaquídeos na proporção de 1:13 em fatias de salmão.

A carga microbiológica inicial de alimentos prontos para consumo deve ser analisada, sendo de suma importância a avaliação de fatores como a manipulação, processamento, armazenamento e exposição à venda, pois poderão influenciar na carga microbiológica final e possível causa de DTA[4]. As DTA são um dos maiores problemas em Saúde Pública do mundo.

Nos Estados Unidos, cerca de 48 milhões de surtos de DTA são notificados ao ano, em que os restaurantes são os principais focos a uma taxa de ocorrência de 66%[42].

No caso da culinária japonesa, *sushi* e *sashimi* têm sido suspeitos de causar DTA, e a conservação representa ponto chave a obtenção de produtos seguros do ponto de vista alimentar. De acordo com a USFDA (*Food and Drug Administration the States United*), os peixes destinados ao consumo cru devem ser armazenados a temperaturas <-35ºC por 15 dias ou a temperatura <-20 ◦C durante 7 dias[41].

Os resultados deste estudo mostraram altos níveis de contaminação por coliformes a 35ºC e 45ºC, presença de *E. coli* (5%) e *Salmonella* sp. (5%), presença de *Aeromonas* spp. (95%) e identificação de *Vibrio* sp., embora ausência de *V. parahaemolyticus*. E ainda, segundo a legislação vigente, 15 (25%) das 60 amostras apresentam condições sanitárias insatisfatórias. Portanto, recomenda-se melhor controle de matéria-prima, melhorias no controle de qualidade e execução de boas práticas, e priorizar controle de temperatura de conservação do pescado em suas

etapas produtivas, visando a segurança alimentar, tal como acontece com qualquer alimento pronto para o consumo, ou seja, deve-se garantir a disponibilidade de alimentos seguros ao consumidor, o que é fundamental na prevenção de surtos de origem alimentar em unidades de produção de alimentos – sob serviço local ou de entrega, sejam estas com fornecimento de preparações nacionais ou estrangeiras.

Conclusões

As amostras de sashimi analisadas apresentam condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, devido a presença de coliformes a 35ºC e a 45ºC. E a presença de *E. coli* em amostras indica contaminação de origem fecal desses alimentos.

As amostras contaminadas por *Salmonella* sp. foram caracterizadas como impróprias ao consumo humano;

As bactérias *Aeromonas* spp. identificadas - *A. hydrophila* e *A. caviae* - apresentam risco de causar DTA e infecções extra intestinais em humanos;

As amostras não apresentam riscos de veicular *Staphylococcus* coagulase positivo e apresentam elevada carga microbiana de *Staphylococcus* coagulase negativo.

As amostras como próprias ao consumo, devido à ausência de *V. parahaemolyticus*. Entretanto, podem veicular outras espécies de *Vibrio*.

Referências

1 Abdullah AI, Hart CA, Winstanley C. Molecular characterization and distribution of virulence-associated genes among Aeromonas isolates from Libya. *J.of Appl. Microbiol.***,** Liverpool, 2003; 95(5):1001-7.

2 Adams AA, Beeh JL, Wekell MM. Health risks of salmon sushi*. The Lancet*, London, 1990; 24(1):13-28.

3 Alaboudi AR, Ababneh M, Osaili TM, Al Shloul K. Detection, Identification, and Prevalence of Pathogenic Vibrio parahaemolyticus in Fish and Coastal Environment in Jordan. *J Food Sci.* 2016 Jan;81(1): M130-4. Epub 2015 Nov 10.

4 Angelidis AS, Chronis EN, Papageorgiou DK, Kazakis II, Arsenoglou KC, Stathopoulos GA. Non-lactic acid, contaminating microbial flora in ready-to-eat foods: a potential food-quality index. *Food Microbiol,* USA, 2006; 23(1): 95-100.

5 Atanassova V, Reich F, Klein G. Microbiological quality of sushi from sushi bars and retailers. *J Food Prot*, USA, 2008; 71(4): 860.

6 Barcellos LJG, Kreutz LC, Rodriques LB, Santos LR, Motta AC, Ritter R et al. Aeromonas hydrophila em Rhamdia Quelen: aspectos macro e microscópico das lesões e perfil de resistência a antimicrobianos. *Bol Inst de Pesca*, São Paulo, 2008; 34(3): 355-63.

7 BRASIL. Secretaria Municipal de Saúde – SMS. Portaria n.º 2619/11 - Regulamento de Boas Práticas e de Controle de condições sanitárias e técnicas das atividades relacionadas à importação, exportação, extração, produção, manipulação, beneficiamento, acondicionamento, transporte, armazenamento, distribuição, embalagem, reembalagem, fracionamento, comercialização e uso de alimentos,

águas minerais e de fontes, bebidas, aditivos e embalagens para alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil***,** Brasília, DF, 2011. Disponível em:<http://trinutri.com.br/portaria.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2015.

8 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 216, de 15 de setembro de 2004. Estabelece procedimentos de boas práticas para serviços de alimentação a fim de garantir as condições higiênico-sanitárias do alimento preparado. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil,* Brasília, DF, 2004. Disponível em: < http://www2.planalto.gov.br/ >. Acesso em: 10.jan. 2017.

9 BRASIL. Conselho Federal de Nutricionistas. Resolução CFN nº 380, de 28 de dezembro de 2005. Dispõe sobre a definição das áreas de atuação do nutricionista e suas atribuições, estabelece parâmetros numéricos de referência por área de atuação, e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil,* Brasília, DF, 2006. Disponível em: < http://www.cfn.org.br/novosite/pdf/res/2005/res380.pdf >. Acesso em: 10.jan. 2017.

10 BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução - RDC n.º 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil,* Brasília, DF, 2001. Disponível em: < http://www2.planalto.gov.br/ >. Acesso em: 15.jan. 2017.

11 Cantas L, Midtlyng PJ, Sørum H. Impact of antibiotic treatments on the expression of the R plasmid transgenes and on the host innate immune activity during pRAS1 bearing *Aeromonas hydrophila* infection in zebrafish (Danio rerio). *BMC Microbiol,* 2012; 12(1):1. DOI: 10.1186/1471-2180-12-37

12 Carnahan AM, Behram S, Joseph SW. Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *J Clin Microbiol*, Washington, 1991; 29 (12): 2843-49. PMCID: PMC270444

13 CFS. Microbiological Guidelines for Food (For ready-to-eat food in general and specific food items). *Centre for Food Safety*. Disponível em: <http://www.cfs.gov.hk/english/food_leg/files/food_leg_Microbiological_Guidelines_for_Food_e.pdf>. Acesso em: 12 Jan. 2014.

14 Deodhar LP, Saraswathi K, Varudkar A. *Aeromonas* spp. and their association with human diarrheal disease. *J Clin Microbiol*, India, 1991; 29 (5): 853-6.

15 Evangelista-Barreto NS, Carvalho FCT, Vieira RHSF, Reis CMF, Macrae A, Rodrigues DP. Characterization of Aeromonas species isolated from an estuarine environment. *Braz J Microbiol*, Cruz das Almas, 2010; 41(2); 452-60. DOI: 10.1590/S1517-83822010000200027

16 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The State of World Fisheries and Aquaculture 2012. Rome: FAO, 2012. 209p.

17 Franco BDGM, Landgraf M**.** Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Editora: Atheneu, 2008. 99p.

18 Freitas IMS, Shinohara NKS, Silva GD, Demetrio AA, Agnani JAT, Siqueira LP. Boas Práticas de Manipulação na Culinária Japonesa. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2009, Recife. *Anais...*Recife: UFRPE.

19 Germano PMI, Miguel M, Miguel O, Germano MIS. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. *Rev Hig Aliment*, São Paulo, 1991; 7(27): 6-11.

20 Ghenghesh KS, Ahmed SF, El-Khalek RA, Al-Gendy A, Klena J. Aeromonas-associated infections in developing countries. *J Inf Dev Count*, 2008; 2 (2): 81-98.

21 Gram L, Melchiorsen J. Interaction between fish spoilage bacteria Pseudomonas spp. and Shewanella putrefaciens in fish extracts and on fish tissue. *J Appl Bacteriol,* Londron, 1996; 80 (6): 589-95. PMID: 8698659

22 Havellar AH, Vonk M. The preparation of ampicilin dextrin agar for the enumeration of Aeromonas in water. *Lett Appl Microbiol*, Oxford, 1988; (7): 169-71.
23 Herrera FC, Santos JA, Otero A, Garcia-Lopez ML. Occurence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. *J Appl Microbiol,* Spain, 2006; 100(3): 527-36. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02848.x.
24 Hoffmann FL, Garcia-Cruz CH, Vinturim TM, Fázio MLS. Levantamento da qualidade higiênico-sanitária de pescado comercializado na cidade de São José do Rio Preto (São Paulo). *Rev Hig Aliment*, São Paulo, 1999; 13 (64): 45-8.
25 Jain S, Chen L, Dechet A, Hertz AT, Brus DL, Hanley K et al. An outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with sushi restaurants in Nevada, 2004. *Clin Inf Dis*, New York, 2008; 47 (1): 1–7. DOI: 10.1086/588666
26 Jay JM. Microbiologia de Alimentos. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.
27 Lee JH, Hwang J, Mustapha A. Popular ethnic foods in the United States: A historical and safety perspective *Comprehensive Reviews in Food Sci and Food Saf,* 2014; 13: 2-17. DOI: 10.1111/1541-4337.
28 Liang W-L, Pan I-L, Cheng H-L, Li T-C, Yu PH-F, Chan S-W. The microbiological quality of take-away raw salmon finger sushi sold in Hong Kong. *Food Cont,* Hong Kong, 2016; 69 (1): 45-50. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.04.015
29 Majeed KN, Egan AF, Mac Rae IC. Production of exotoxins by *Aeromonas* spp. at 5°C**.** *J Appl Microbiol*, Spain, 1990; 69 (3): 332-7. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1990.tb01524.x
30 Medeiros EAS, Nouer SA, Silva NF, Grinbaum R, Pereira APP, Long JC. Tratamento das principais infecções comunitárias e relacionadas à assistência á saúde e a profilaxia antimicrobiana em cirurgia. *ATM Racional,* 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo3/objetivos.htm>. Acesso em: Jan 2016.
31 Miguéis S, Santos C, Saraiva C, Esteves A. Evaluation of ready to eat sashimi in northern Portugal restaurants**.** *Food Cont*, Portugal, 2015; 47 (1): 32-6. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.06.025
32 Montanari AS, Romão NF, Sobral FOS, Marmitt BG, Silva FPS, Martinelli TCA. Avaliação da qualidade microbiológica de sashimis de salmão, preparados e comercializados em restaurantes japoneses no município de Ji-Paraná – RO. *J Basic Educat, Tec and Tchnolog*, 2015; 2 (1): 4-16. ISSN: 2446-4821
33 Mouta RMA, Melo MB, Araújo AB, Aguiar FLL, Fontenelle ROS. Qualidade microbiológica do sushi comercializado na cidade de Sobral-CE. *Rev da Univ Vale do Rio Verde*, Três Corações, 2014; 12 (2): 277-84. DOI: 10.5892/ruvrd.v12i2.1447
34 Muscolino D, Giarratana F, Beninati C, Tornambene A, Panebianco A, Ziino G. Hygienic-sanitary evaluation of sushi and sashimi sold in Messina and Catania, Italy. *Ital J Food Saf*, 2014; 3 (1): 1701. DOI: 10.4081/ijfs.2014.1701
35 Namdari H, Bottone EJ. Microbiologic and Clinical Evidence Supporting the Role of *Aeromonas caviae* as a Pediatric Enteric Pathogen. *J Clin Microbiol*, New York, 1990; 28 (5): 837-40. PMCID: PMC267819
36 Nespolo NM, Martineli TM, Rossi Jr OD. Microbiological Quality Of Salmon (*Salmo Salar*) Sold In Cities Of The State Of São Paulo, Brazil. *Braz J Microbiol*, São Paulo, 2012; 43 (4): 1393-400.
37 Nogara M, Rossari C, Stella S, Cozzi M, Cantoni C. Valutazione microbiologica del pesce crudo utilizzato per la preparazione del sushi. *Ital J Food Saf***,** 2004; 134-6.
38 Ogawa M, Maia ELM. Manual de Pesca – Ciência e Tecnologia do Pescado. São Paulo: Varela. 1999; 1: 453.

39 Palumbo SA, Maxino F, Williams AC, Buchanan RL, Thayer DW. Starch-ampicilin agar for the quantitative detection of Aeromons hydrophila*. Appl Env Microbiol,* Washington, 1985; 50 (4): 1027-30.
40 Peixoto JS, Sá MCA, Gordiano LA, Costa MM. *Aeromonas* spp.: fatores de virulência e perfis de resistência à antimicrobianos e metais pesados. *Arq Ins Biol*, São Paulo, 2012; 79 (3): 453-61.
41 Po LG. A food inspector's guide to ethnic foods in Michigan. *Michigan State Univ*, 2007:10.
42 Scallan E, Griffin PM, Angulo FJ, Tauxe RV, Hoekstra RM. Foodborne illness acquired in the United States–unspecified agents. *Emerg Infect Dis*, Atlanta, 2011; 17 (1): 16–22. DOI: 10.3201/eid1701.P21101
43 Silva Junior EA. Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação. 7. ed. São Paulo: Varela, 2014: 694.
44 Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. 1. ed. São Paulo: Varela, 1997: 107.
45 Silva RML. Bactérias do gênero *Aeromonas* e indicadores de qualidade da água em pisciculturas da região da baixada ocidental maranhense. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2010.
46 Sørum H. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens**.** In: Aarestrup FM, editor. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Washington, DC, 2006; 213-37. Disponível em: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817534.chap13>. Acesso em: 02 fev. 2017.
47 Sumner J, Ross T. A semi-quantitative seafood safety risk assessment. *Int J Food Microbiol*, 2002; 77 (1): 9-55.
48 Ullmann D, Krause G, Knaber D, Weber H, Beutin L. Isolation and characterization of potencially human pathogenic, cytotoxin producing *Aeromonas* strains from retailed seafood in Berlin, Germany**.** *J Vet Med***,** Berlin, 2005; 52 (2): 82-7.
49 Valente D, Passos ADC. Avaliação higiênico-sanitária e físico-estrutural dos supermercados de uma cidade do Sudeste do Brasil. *Ver Bras Epidem*. 2004; 7(1), 80-7.
50 Vanderzant C, Splitt-Stoesser DF. Compendium of Methods for the microbiological. Examination of food, American Public Health Association, 1992: 1219.
51 Velloso EA. Avaliação sensorial e físico-química de filés de tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*) refrigerados e submetidos à radiação gama. 2004: 68. (Monografia em Especialização em Irradiação de Alimentos) - Universidade Federal Fluminense, Niterói,2004.
52 Vieira RHSF, Saker-Sampaio S. O emprego do gelo nos barcos de pesca. *In*: Vieira RHSF Editor. Microbiologia, higiene e qualidade do pescado. São Paulo: Varela. 2003: 37-43.

Tabelas

Tabela 1- Determinação do Número Mais Provável (NMP/g) de coliformes a 35ºC em amostras de *sashimi* de salmão de dez restaurantes de São Luís - MA, 2017

Local de Coleta	1º coleta	2º coleta	3º coleta	4º coleta	5º coleta	6º coleta	Média[b] / Desvio Padrão	
R1	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$4,6 \times 10$	$2,4 \times 10^2$	$1,9 \times 10^{2\ a}$	$\pm 0,9 \times 10^2$
R2	$2,4 \times 10^2$	$0,5 \times 10$	$2,4 \times 10^2$	$2,1 \times 10$	$2,1 \times 10$	$2,4 \times 10^2$	$1,3 \times 10^{2\ a}$	$\pm 1,2 \times 10^2$
R3	$2,4 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$0,9 \times 10$	$2,4 \times 10^2$	$4,6 \times 10$	$2,4 \times 10^2$	$1,5 \times 10^{2\ a}$	$\pm 1,0 \times 10^2$
R4	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$4,6 \times 10$	$2,4 \times 10^2$	$1,5 \times 10$	$0,4 \times 10$	$1,3 \times 10^{2\ a}$	$\pm 1,2 \times 10^2$
R5	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$2,4 \times 10$	$1,8 \times 10^{2\ a}$	$\pm 0,9 \times 10^2$
R6	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$0,9 \times 10$	$1,1 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$1,6 \times 10^{2\ a}$	$\pm 1,0 \times 10^2$
R7	$1,5 \times 10$	$2,4 \times 10^2$	$1,5 \times 10$	$2,4 \times 10^2$	$4,6 \times 10$	$2,4 \times 10^2$	$1,3 \times 10^{2\ a}$	$\pm 1,2 \times 10^2$
R8	$4,6 \times 10$	$2,4 \times 10^2$	$0,9 \times 10$	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$4,6 \times 10$	$1,4 \times 10^{2\ a}$	$\pm 1,1 \times 10^2$
R9	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$2,2 \times 10^{2\ a}$	$\pm 0,5 \times 10^2$
R10	$0,9 \times 10$	$2,4 \times 10^2$	$4,6 \times 10$	$2,4 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$1,5 \times 10^{2\ a}$	$\pm 1,1 \times 10^2$

Coeficiente de Variação de coliformes a 35ºC (CV) = 26,54 %
[a] Médias seguidas por letras iguais não apresentam diferença estatística
[b] Os dados foram transformados para log X+1 para entrar na normalidade

Tabela 2- Determinação do Número Mais Provável (NMP/g) de coliformes a 45ºC em amostras de *sashimi* de salmão em dez restaurantes de São Luís - MA, 2017

Local de Coleta	1º coleta	2º coleta	3º coleta	4º coleta	5º coleta	6º coleta	Média[b] / Desvio Padrão	
R1	$2,4 \times 10^2$	$0,4 \times 10^2$	$0,9 \times 10$	$0,5 \times 10^2$	$0,5 \times 10^2$	$0,1 \times 10^2$	$0,6 \times 10^{2\ a}$	$\pm 0,9 \times 10^2$
R2	$2,4 \times 10^2$	$0,2 \times 10$	$0,2 \times 10$	$0,4 \times 10$	$0,2 \times 10$	$0,2 \times 10$	$0,4 \times 10^{2\ a}$	$\pm 1,0 \times 10^2$
R3	$2,4 \times 10^2$	$0,6 \times 10^2$	$0,2 \times 10$	$2,4 \times 10^2$	$0,2 \times 10^2$	$0,2 \times 10^2$	$0,9 \times 10^{2\ a}$	$\pm 1,2 \times 10^2$
R4	$2,4 \times 10^2$	$0,1 \times 10$	$0,1 \times 10$	$0,2 \times 10$	$0,2 \times 10$	$0,4 \times 10$	$0,4 \times 10^{2\ a}$	$\pm 1,0 \times 10^2$
R5	$2,4 \times 10^2$	$0,5 \times 10^2$	$0,9 \times 10$	$0,1 \times 10^2$	$0,7 \times 10$	$0,9 \times 10$	$0,5 \times 10^{2\ a}$	$\pm 0,9 \times 10^2$
R6	$2,4 \times 10^2$	$0,2 \times 10$	$0,1 \times 10$	$1,1 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$0,2 \times 10^2$	$0,8 \times 10^{2\ a}$	$\pm 0,9 \times 10^2$
R7	$0,1 \times 10^2$	$0,2 \times 10$	0,0	$0,2 \times 10^2$	$0,5 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$0,5 \times 10^{2\ a}$	$\pm 0,9 \times 10^2$
R8	$0,4 \times 10^2$	$0,4 \times 10$	$0,1 \times 10$	$0,5 \times 10^2$	$0,5 \times 10^2$	$0,2 \times 10$	$0,2 \times 10^{2\ a}$	$\pm 0,2 \times 10^2$
R9	$2,4 \times 10^2$	$0,1 \times 10^2$	$0,1 \times 10$	$0,2 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$0,1 \times 10$	$0,6 \times 10^{2\ a}$	$\pm 0,9 \times 10^2$
R10	$0,2 \times 10^2$	$0,1 \times 10$	$0,2 \times 10$	$0,1 \times 10$	$0,5 \times 10^2$	$0,4 \times 10$	$0,9 \times 10^{2\ a}$	$\pm 0,2 \times 10^2$

Coeficiente de Variação de coliformes a 45ºC (CV) = 49,53%
[a] Médias seguidas por letras iguais não apresentam diferença estatística
[b] Os dados foram transformados para log X+1 para entrar na normalidade

Tabela 3- Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *Staphylococcus* coagulase negativa em amostras de *sashimi* de salmão de dez restaurantes de São Luís - MA, 2017

Local de Coleta	1º coleta	2º coleta	3º coleta	4º coleta	5º coleta	6º coleta	Média[b] / Desvio Padrão	
R1	$1,7x\ 10^4$	<20	$2,1x\ 10^3$	<20	<20	<20	$3,2 \times 10^{3\ a}$	$\pm 7,0 \times 10^3$
R2	$2,0x\ 10^4$	<20	$2,4x\ 10^2$	$4,3x\ 10^3$	$4,3x\ 10^3$	<20	$4,6 \times 10^{3\ a}$	$\pm 7,0 \times 10^3$
R3	$8,0x\ 10^3$	<20	$1,2x\ 10^3$	$5,0x\ 10^4$	<20	<20	$1,0 \times 10^{4\ a}$	$\pm 20 \times 10^3$
R4	$8,0x\ 10^3$	<20	$4,6x\ 10^3$	<20	$4,2x\ 10^2$	<20	$2,2 \times 10^{3\ a}$	$\pm 3,0 \times 10^3$
R5	$3,2x\ 10^3$	<20	<20	$6,3x\ 10^2$	<20	$2,1x\ 10^2$	$0,7 \times 10^{3\ a}$	$\pm 1,0 \times 10^3$
R6	$3,1x\ 10^3$	<20	$1,1x\ 10^3$	$6,0x\ 10^3$	$7,3x\ 10^3$	<20	$3,0 \times 10^{3\ a}$	$\pm 3,0 \times 10^3$
R7	$6,0x\ 10^3$	<20	$6,4x\ 10^3$	$1,3x\ 10^3$	$2,2x\ 10^3$	<20	$3,0 \times 10^{3\ a}$	$\pm 3,0 \times 10^3$
R8	$1,4x\ 10^3$	<20	$6,1x\ 10^2$	$3,0x\ 10^2$	<20	<20	$0,4 \times 10^{3\ a}$	$\pm 0,5 \times 10^3$
R9	$1,8x\ 10^3$	<20	$1,8x\ 10^3$	$7,5x\ 10^2$	<20	<20	$0,7 \times 10^{3\ a}$	$\pm 1,0 \times 10^3$
R10	$5,0x\ 10^3$	<20	<20	$6,0x\ 10^3$	$7,0x\ 10^3$	<20	$3,0 \times 10^{3\ a}$	$\pm 3,0 \times 10^3$

Coeficiente de Variação (CV) = 48,77%
[A] Os dados foram transformados para log X+1 para entrar na normalidade
[a] Médias seguidas por letras iguais não apresentam diferença estatística

Tabela 4: Espécies de bactérias do gênero *Aeromonas* isoladas de amostras de sashimi de restaurantes na cidade de São Luís, 2017

	Restaurantes										
Espécies	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**Total**
A. hydrophila	5	7	6	6	5	7	6	7	5	6	60
A. caviae	0	0	1	0	3	1	0	0	1	0	6
Total	5	7	7	6	8	8	6	7	6	6	66

CAPÍTULO III

Artigo segundo as normas de Cadernos de Saúde Pública

Suscetibilidade à antimicrobianos de bactérias *Aeromonas* sp., *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* isoladas de *sashimi* de salmão (*Salmo salar*)

Resistência de isolados de *sashimi* de salmão a antimicrobianos

Área de concentração: Saúde Pública

Financiamento: À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Maranhão (FAPEMA), Edital n.º 40 /2015; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida; e à Universidade Estadual do Maranhão (UEMA).

Palavras-chave: Pescado cru; Resistência microbiana a drogas; Segurança alimentar

Resumo:

O pescado é a base proteica da maioria das preparações da culinária japonesa, tendo o salmão, como peixe mais consumido. Alimentos à base de pescado podem veicular patógenos causadores de doenças transmitidas por alimentos e, por vezes, de difícil tratamento devido à resistência de cepas às drogas antimicrobianas. Os antimicrobianos são medicamentos utilizados no tratamento de infecções bacterianas. Objetivou-se avaliar a susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* de patógenos isolados de *sashimi* de salmão (*Salmo salar*) em São Luís - MA. Foram isoladas 72 cepas de bactérias, sendo 60 *Aeromonas hydrophila,* seis *Aeromonas caviae,* três *E. coli* e três *Salmonella* sp. Uma das cepas de *Aeromonas* spp. apresentou resistência a todos os antimicrobianos testados e duas cepas a nove dos 11 antimicrobianos. Duas cepas de *E. coli* apresentaram resistência à ampicilina, uma à gentamicina, uma à amicacina e uma à amoxicilina-clavulanato. Uma cepa de *Salmonella* sp. apresentou resistência à amicacina, uma à ampicilina e uma à sulfa-trimetoprim. Constatou-se múltipla resistência de *Aeromonas* sp., *E. coli* e *Salmonella* sp. a diferentes antimicrobianos. Esse é um dado preocupante, especialmente por se tratarem de cepas isoladas a partir de alimentos crus prontos para consumo humano. Sendo importante e necessário o teste de cepa aos demais antimicrobianos disponíveis.

Agradecimentos: À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Maranhão (FAPEMA), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Universidade Estadual do Maranhão (UEMA).

Autores:
Karina Silva Cordeiro[1]- (98) 981179901; karinascordeiro@outlook.com; Colaboração: concepção, projeto, análise e interpretação de dados; redação do artigo; responsável pelos aspectos de garantia da exatidão e integridade da obra.
Lygia Silva Galeno[1]- (98) 988796727; lygiagaleno@outlook.com; Colaboração: análise e interpretação de dados e redação do artigo.
Isabel Azevedo Carvalho[1]- (98) 992216683; isabel.azevedo@gmail.com; Colaboração: revisão crítica relevante do conteúdo intelectual
Francisca Neide Costa[1]- (98)991594215; francisca.cca.uema@gmail.com; Colaboração: revisão crítica relevante do conteúdo intelectual

[1] Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água – Universidade Estadual do Maranhão - Cidade Universitária Paulo VI - s/n - Tiririca l - CEP. 65055-310 - São Luís/MA, Brasil.

Introdução

O pescado é a base proteica, de ótima qualidade nutricional, da maioria das preparações da culinária japonesa, sendo, o salmão, peixe rico em gordura poliinsaturada, como ômega 3 e 6 (ω3 e ω6), e ainda em minerais e vitaminas, o mais consumido dos peixes na composição dessas preparações, principalmente cru ou levemente coccionado. Esta forma de consumo demanda a necessidade de garantia de ingestão destes alimentos de forma segura do ponto de microbiológico e parasitário, haja vista, a ausência ou ineficiência da etapa de tratamento térmico, o que minimizaria ou eliminaria contaminações[1].

Doenças transmitidas por alimentos (DTA) são causadas por organismos ou toxinas presentes em alimentos contaminados. O pescado pode veicular uma variedade de agentes patogênicos ao homem e causar toxinfecções alimentares, sendo tratado como questão de saúde pública na atenção à qualidade sanitária de peixes e suas preparações[2]. O pescado é dotado de fatores intrínsecos, como, alto valor nutricional, atividade de água elevada e pH próximo a neutralidade, que podem facilitar o desenvolvimento microbiano e viabilizar a deterioração[3].

A estatística dos sistemas de vigilância mostra aumento do número de casos de DTA em todo o mundo, independentemente da composição racial, grau de desenvolvimento, condição socioeconômica e cultural[4]. A deterioração ocorre principalmente por ação microbiana e indica a redução de qualidade e segurança do produto. Micro-organismos como *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* enteritidis são patógenos importantes no contexto de saúde pública mundial por estarem associados a DTA[5].

Nos alimentos, muitos métodos são aplicados com o intuito de bloquear ou controlar o crescimento de micro-organismos, compreendendo o uso de processos físicos, biológicos ou químicos. Além destes há a crescente busca por substâncias naturais com ação antimicrobiana, que possam ser utilizadas na indústria alimentícia[6]. Pessoas são acometidas por DTA e nem sempre há causa evidente. A qualidade dos alimentos pode estar diretamente associada a índices de toxinfecção além de outras doenças registradas no âmbito da saúde pública.

O emprego de antimicrobianos, na prevenção e terapêutica de doenças, é acentuado na aquicultura e resulta em aumento na resistência bacteriana a inúmeros medicamentos, como no caso de espécies de *Aeromonas* sp.[7], e pode interferir negativamente no tratamento de doenças causadas por bactérias veiculadas por estes alimentos, existindo uma relação direta entre o quantitativo de antimicrobianos usados e a incidência de resistência bacteriana[8]. O uso

de medicamentos na aquicultura resulta na proliferação de bactérias multirresistentes a antimicrobianos, sendo considerado agravo latente a espécie humana através do consumo de alimentos, veiculadores de bactérias resistentes a antimicrobianos de uso na rotina clínica[9].

De acordo com a ANVISA[10], os antimicrobianos são pertencentes a uma classe de medicamentos utilizados no tratamento de infecções bacterianas. Portanto, são agentes medicamentosos que afetam os pacientes, homens ou animais, e interferem de forma significativa o ambiente de uso, devido a modificações na ecologia microbiana.

Os antimicrobianos seguem recomendações para cada grupo de micro-organismos e incluem agentes de eficácia que se mostram aceitáveis ao teste *in vitro*. Testes para confirmação de eficácia de antimicrobianos frente a bactérias são constantemente realizados, cuja importância reside na ratificação de sua ação bactericida, vista a nortear sua utilização e prescrições a indivíduos acometidos por infecções[11].

Considerações pertinentes aos agentes de grupos teste / relatório, específicas a utilização de antimicrobianos, devem considerar a prevalência de resistência, a eficácia clínica, a minimização do surgimento de resistência, o custo, as indicações e recomendações de consenso atual para drogas de primeira escolha e drogas alternativas[11].

Mota et al.[12] descrevem que a prescrição adequada de antimicrobianos deve incluir: conhecimento sobre o hospedeiro; entendimento sobre os conceitos de colonização, contaminação e infecção; recolha e teste de culturas; microbiologia clínica; micro-organismos habituais em humanos; e conhecimento total sobre a farmacocinética, farmacodinâmica, espectro de ação e outros das drogas antimicrobianas disponíveis.

Este estudo tem como objetivo avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos de *Aeromonas* spp., *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* isolados de *sashimi* de salmão (*Salmo salar*).

Materiais e Métodos

Origem dos isolados

Foram analisados os perfis de susceptibilidade à antimicrobianos de 72 cepas bacterianas de *Aeromonas* sp. (66), *Salmonella* sp. (3) e *Escherichia coli* (3) isoladas de *sashimi* de salmão, de acordo com a metodologia da *American Public Health Association* (APHA), descrita *no Compendium of Methods for of Microbiological Examination of Foods*[13].

Antibiograma

Os testes susceptibilidade *in vitro*, por disco difusão, aos antimicrobianos (foram realizados de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute (*CLSI). Os antimicrobianos testados (CECON, SP, Brasil) seguiram as recomendações por grupo de organismos e incluíram: Grupo A, agentes antimicrobianos considerados apropriados para inclusão de rotina, testes de painel principal, bem como para a comunicação de rotina de resultados para os grupos de organismos específicos, são estes: Ampicilina 10µg - AMP e Gentamicina 120 µg – GEN; e Grupo B, agentes antimicrobianos que podem justificar testes primários, mas podem ser reportados apenas seletivamente, são estes: Amicacina 30 µg - AMI, Amoxilina-clavulanato 20/10 µg - AMC, Cefuroxima 30 µg - CRX, Cefepime 30 µg - CPM, Cefoxitina 30 µg - CFO, Cefotaxima 30 µg - CTX, Levofloxacina 5 µg - LVX, Piperacilina 100 µg – PPT e Sulfa-Trimetoprim 25 µg – SUT. Com resultados interpretativos 'resistente', 'resistência intermediária' ou 'sensível' e semelhante eficácia clínica[10].

Índice de Múltipla Resistencia (MAR)

O índice de MAR foi utilizado para determinação da múltipla resistência. Definido como a/b, onde "a" é o número de antimicrobianos a que o isolado foi resistente e "b" número de antimicrobianos a que o isolado foi exposto. Valores >0,17 indicam multirresistência[14].

Resultados

Todas as cepas de *E. coli* foram sensíveis aos antimicrobianos cefepime, cefotaxima, levofloxacina, piperacilina e sulfa-trimetoprim, ao passo que duas (66,7%) apresentaram resistência à ampicilina. Uma cepa apresentou resistência à gentamicina (33,3%), uma à amicacina (33,3%) e uma à amoxicilina-clavulanato (33,3%) (**Figura 1**).

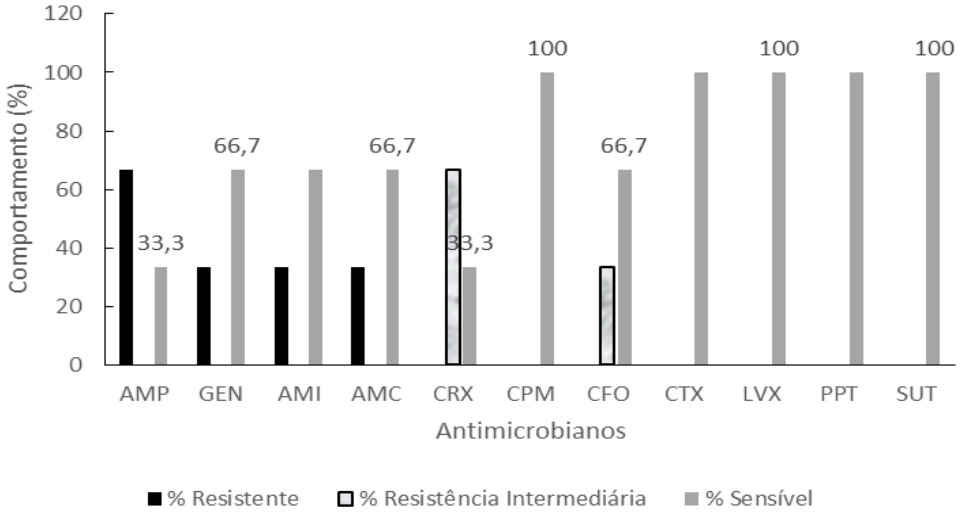

Figura 1: Resultado do teste de suscetibilidade das cepas de *Escherichia coli*, isoladas de *sashimi* de salmão, frente aos antimicrobianos testados, 2017.

A **Figura 2** mostra o resultado dos testes de sensibilidade antimicrobiana das cepas de *Salmonella* sp., em que todas as cepas foram sensíveis aos antimicrobianos amoxicilina-clavulanato, cefepime, cefotaxima, cefuroxima, gentamicina, levofloxacina e piperacilina. Das três cepas isoladas, apenas uma apresentou resistência à amicacina, e uma apresentou resistência a dois antimicrobianos - ampicilina e sulfa-trimetoprim.

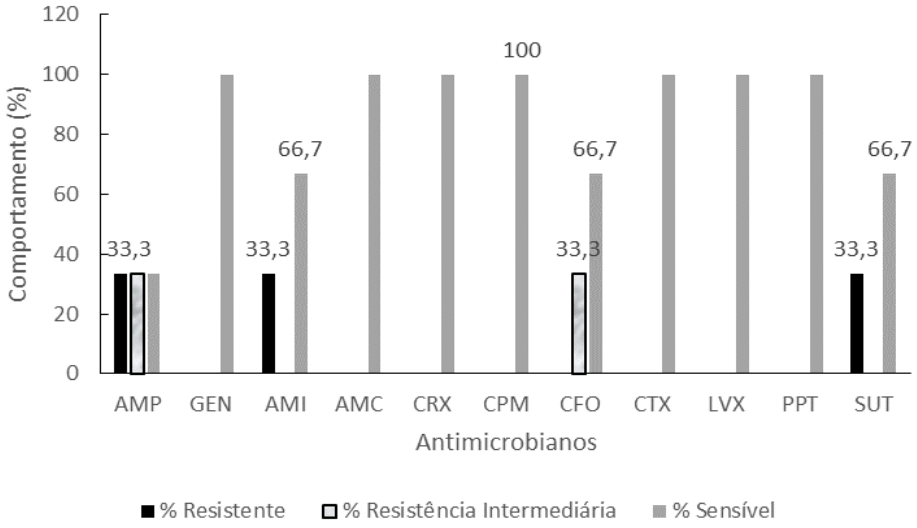

Figura 2: Resultado do teste de suscetibilidade das cepas de *Salmonella* sp. isoladas de *sashimi* de salmão, frente aos antimicrobianos estudados, 2017.

Em média, as cepas de *Aeromonas* sp. foram resistentes a cinco dos antimicrobianos testados, sendo uma delas resistente a todos os antimicrobianos e duas cepas resistentes a nove dos 11 antimicrobianos testados. Todas as cepas se mostraram resistentes a pelo menos dois antimicrobianos, com resistência à ampicilina (97%), à cefuroxima (90,9%) e à amoxicilina-clavulanato (77,3%). Por outro lado, 81,8% destas foram sensíveis ao cefepime (**Figura 3**).

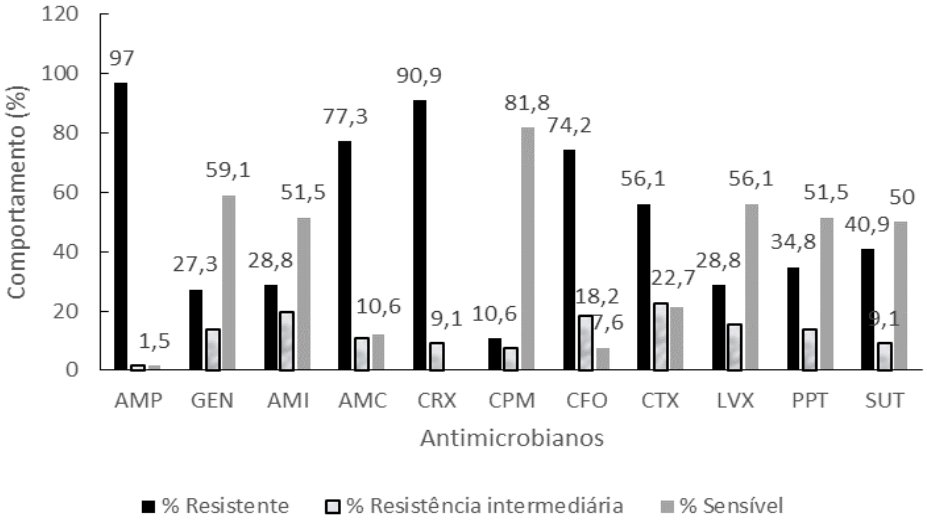

Figura 3: Resultado do teste de suscetibilidade das cepas de *Aeromonas* sp. isoladas de *sashimi* de salmão, frente aos antimicrobianos estudados, 2017.

Os valores encontrados para Índice MAR, de acordo com a Tabela 1, apresentam-se com variação de 0,18 a 1,00 nos isolados de *Aeromonas* sp. *E. coli* e *Salmonella* sp. obtidos de *sashimi* de salmão, e evidenciam a multirresistência dos isolados de *Aeromonas* sp. em 100%, de *E. coli* em 33% e *Salmonella* sp. em 33%. Uma cepa de *Aeromonas* sp. apresentou-se resistente a todos os onze antimicrobianos testados (MAR = 1,00).

Tabela 1: Índice de Múltipla Resistência aos Antimicrobianos (MAR) de *Aeromonas* sp., *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. provenientes de s*ashimi* de salmão, 2017

	Antimicrobianos (n)										
Isolados testados N (%)	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**Total**
Aeromonas sp.	4 (6)	5 (7)	10 (15)	9 (17)	16 (24)	12 (18)	7 (11)	2 (3)	-	1 (11)	66
E. coli	-	-	1 (33)	-	-	-	-	-	-	-	3
Salmonella sp.	1 (33)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Índice MAR	0,18	0,27	0,36	0,45	0,54	0,63	0,72	0,81	-	1,00	-

n: Número de antimicrobianos
N (%): Número de bactérias que apresentam resistência ao "n" de antimicrobianos e respectiva porcentagem

Discussão

O uso indiscriminado de antimicrobianos na aquicultura propicia o aparecimento de micro-organismos resistentes aos mesmos produzindo consequências sobre o uso destes na terapêutica de agravos [15]. De acordo com CLSI[11], *E. coli* não apresenta resistência intrínseca a β-lactâmicos, no entanto duas das três cepas isoladas apresentaram resistência à ampicilina, o que pode estar associado à resistência adquirida.

Em estudo de Evangelista-Barreto[16], não foi encontrada resistência a antimicrobianos testados para cepas de *E. coli*, isoladas de carne de siri, sendo satisfatoriamente sensível aos β-lactâmicos, como ampicilina; e aminoglicosídeos, como amicacina; quinolonas, como ciprofloxacina; e sulfonamidas, como sulfa-trimetoprim. Contrariamente, observou-se em nossa pesquisa a resistência a ampicilina e amicacina e resultado semelhante quanto para sensibilidade a quinolona levofloxacina e a sulfa-trimetoprim.

Entre as bactérias Gram negativas, o mecanismo de resistência aos ß-lactâmicos, como a ampicilina é comumente realizada através da degradação da droga por ação de ß-lactamases[17] Bactérias da família Vibrionaceae, comuns ao ambiente marinho, são naturalmente resistentes à ampicilina[18]. Portanto, a transferência de plasmídeos - que codificam determinantes de resistência – podem produzir bactérias patogênicas aos humanos, animais e peixes e bactérias resistentes a diversas drogas, incluindo bactérias de outros nichos ecológicos[19].

De acordo coma ANVISA[10], genes encontrados em plasmídeos ou transposons podem transferir a bactérias a capacidade de modificação enzimática, que conferem resistência destas aos aminoglicosídeos (amicacina), portanto perdem a habilidade de inibição da síntese de proteína bacteriana.

Dias et al.[20] encontraram resistência de 40,9% ao antimicrobiano ampicilina, de cepas de *E. coli*, e sensibilidade a gentamicina, cefoxitina, cefotaxima, ciprofloxacina, apoiando os dados encontrados na presente pesquisa, quanto à resistência à ampicilina e sensibilidade à cefoxitina, cefotaxima e levofloxacina; divergindo para gentamicina, pois na presente pesquisa foi encontrada resistência de uma cepa ao referido antimicrobiano.

Segundo CLSI[11], para *Salmonella* sp. e *Shigella* sp., aminoglicosídeos, cefalosporinas de primeira e segunda geração, e cefamicinas podem apresentar-se eficazes *in vitro*, porém são ineficazes clinicamente. Espécies de *Salmonella* sp. não apresentam resistência intrínseca a β-lactâmicos, como ampicilina, entretanto uma das cepas isoladas neste estudo apresentou resistência a este antimicrobiano, refletindo a aquisição de resistência por interação com outros micro-organismos ou troca de plasmídeos.

Plasmídeos e transposons têm sido relacionados a isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas* spp.[21]. No meio aquático, podem suceder trocas de plasmídeos entre micro-organismos, produzindo bactérias multirresistentes. Portanto, pescados, consumidos por humanos, podem constituir produtos contaminados por bactérias resistentes a antimicrobianos[22]. Diversos mecanismos de resistência a antimicrobianos repercutem em terapêuticas de alto custo e agravos a saúde[23].

Dados de resistência a antimicrobianos, sobre bactérias oriundas de alimentos, são importantes para indicar uma droga que seja eficiente no tratamento de pacientes acometidos por infecções causadas bacterianas. Dentre as espécies de importância clínica, *A. hydrophila*, *A. caviae*, assim como outras podem ser isoladas de répteis, anfíbios, peixes e aves, sendo a *A. hydrophila* um importante patógeno para peixes e de importância a saúde pública, pois desenvolvem-se sob temperatura de refrigeração e produzem exotoxinas[24]. Segundo Pablos et al[25] nos ambientes de aquicultura é crescente a incidência de resistência de *Aeromonas* spp. a antimicrobianos, portanto, o uso de antibióticos não pode ser dissociado do acompanhamento de dados de susceptibilidade da bactéria alvo[15].

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a ocorrência de multirresistência microbiana também pode ser influenciada por fatores como: baixo nível socioeconômico de

indivíduos, acesso equivocado aos medicamentos, propaganda de novas drogas, processos terapêuticos errôneos, drogas adulteradas, primeira escolha por antimicrobianos de amplo espectro e alimentos contaminados com micro-organismos resistentes. O uso racional de antimicrobianos é uma das metas definidas pela OMS para o século XXI. Entretanto, na piscicultura ainda utilizam de forma irracional e agressiva os quimioterápicos para debelar infecções bacterianas e infestações de ectoparasitas, bem como desinfetantes para evitar a propagação de doenças[26].

Os resultados de resistência a cefuroxima, amoxicilina-clavulanato e cefoxitina corroboraram com os achados por Silva[27] que encontrou em isolados de *Aeromonas* spp. resistência a cefuroxima (78,6%) e Suhet[28] que verificou 100% de resistência de *Aeromonas* spp. à amoxicilina, em amostras de tilápia do Nilo. A resistência de *Aeromonas* spp. à cefoxitina também foi confirmada por Cereser[29], com percentual de 75%, valor bem próximo ao encontrado no presente trabalho. Miranda e Zemelman[22] observaram que as bactérias isoladas de salmão provenientes de fazendas no Chile apresentaram uma elevada incidência de resistência aos β-lactâmicos (ampicilina e amoxicilina). Bactérias do gênero *Aeromonas* tem alta prevalência de genes para β- lactamase, que conferem resistência a β- lactâmicos, algumas das quais resistentes à inibição do ácido clavulânico[30].

A resistência de *Aeromonas* sp. a múltiplos antimicrobianos pode ser reforçada pelo ambiente de cultura dos peixes, sendo o salmão consumido no Brasil proveniente principalmente do Chile [31]. Onde a aquicultura praticada ocorre em água doce e a maioria não tem controle sobre os efluentes, fato este que inclui o presumível risco de resistência em consequência da disseminação de genes em águas ao redor das fazendas, enfatizando a hipótese de que bactérias resistentes também estão presentes em ambientes de criação de salmão em períodos em que nenhuma terapia antibacteriana foi administrada[22]. Sendo a *Aeromonas* sp. comum ao meio aquático marinhos, a contaminação de peixes (matéria-prima de preparações como *sashimi*) por bactérias resistentes pode manter-se mesmo após serem submetidos a baixas temperaturas – para conservação do pescado – e constituírem possíveis causas de agravo a saúde de consumidores do produto *in natura.*

Destaca-se que o uso excessivo de antimicrobianos na aquicultura do salmão tem efeito não só no local de criação, mas em áreas distantes do local de cultivo. Buschmann et al.[32] verificaram que resíduos de flumequina (quinolona) em sedimentos de áreas a 8 Km do local de cultivo do pescado, bactérias destes sedimentos resistentes a quinolonas e estas abrigavam genes codificados por plasmídeos, que são determinantes de múltipla resistência a

antimicrobianos. Associaram a presença desses resíduos como consequência do transporte de correntes marinhas e carreados de áreas de aquicultura da região que utilizam este antimicrobiano. Ressalta-se, portanto, a manutenção da população bacteriana em ambiente aquático, a transferência de resistência entre os micro-organismos e da mesma forma a manutenção do perfil bacteriano nos produtos de pesca, destinados a alimentação humana.

Os fatores atribuídos a resistência à antimicrobianos, por bactérias isoladas de frutos do mar, incluem à presença de plasmídeo, à utilização indiscriminada de antibióticos na aquicultura e à transferência genética horizontal[33]. A multirresistência a antibióticos, elevada em ambiente e devida à constante utilização desses medicamentos, tem apresentado índices de multirresistência superiores a 0,2 e valores menores ou igual a 0,2 estão normalmente associados a antimicrobianos de uso ocasional[34].

Fatores de virulência, como citotoxinas geneticamente semelhantes a shiga-toxina de *E. coli*, foram identificados em plasmídeos de *Aeromonas* spp., concluindo-se que a transferência genética de fatores de resistência a medicamentos, assim como outros agentes de patogenia, pode ser transferida entre os micro-organismos[25].

Machado et al[35], em análise de pescado marinho comercializados na feira do Mucuripe, Fortaleza-CE, observaram 17 perfis de multirresistência distintos nos isolados de *E. coli* e apontaram que tais perfis estavam relacionados a um ou mais antimicrobianos do grupo das penicilinas, tetraciclinas e quinolonas. Sendo encontrado, para 68,7% das cepas com perfil de multirresistência, o índice de Mar igual ou maior que 0,25 - portanto resistentes a dois ou mais dos antimicrobianos testados. Sendo os resultados associados a elevada manipulação do pescado no ambiente de venda, assim como a manipulação de outros peixes e contato com vários utensílios no mesmo ambiente. Tal contato pode possibilitar à contaminação cruzada e transferência de bactérias multirresistentes entre os pescados manuseados.

Os isolados multirresistentes encontrados a partir de amostras de *sashimi* de salmão sugerem a possível transmissão de genes de resistência entre os micro-organismos: *Aeromonas* spp. e bactérias do trato intestinal humano, como *E. coli* e *Salmonella* sp. E a baixa sensibilidade aos antimicrobianos testado reduz a gama de medicamentos passíveis de administração no caso de infecções possivelmente causadas pelo consumo destes alimentos.

Evidências de multirresistência aos antimicrobianos tem sido consideradas como preocupação à saúde pública e comunidade científica, por afetar negativamente as populações de micro-organismos, alterando o nicho ecológico. Portanto, procedimentos controlados de uso de

medicamentos são necessários ao impedimento e minimização de riscos ao ambiente e a saúde pública sem comprometer a produção na aquicultura[36].

É vital que a população consumidora tenha melhor acesso a informações, que surtos sejam notificados e órgãos fiscalizadores e legisladores tenham maior atenção, com vistas a prevenir doenças transmitidas por alimentos. Destaca-se ainda a necessidade do acompanhamento e controle do pescado, nos locais de produção, como a monitorização do ambiente aquático, procedimentos de manejo e captura dos peixes, assim como a rigorosa fiscalização do produto importado, nos portos de recebimento.

Conclusão

Constatou-se múltipla resistência de cepas de *Aeromonas* sp., *E. coli* e *Salmonella* sp. a diferentes antimicrobianos, mas principalmente à ampicilina - antimicrobiano de primeira escolha. Esse é um dado preocupante, especialmente por se tratar de cepas isoladas a partir de alimentos crus prontos para consumo.

A bactérias, *Aeromonas* spp., *E. coli*; e *Salmonela* sp., mostraram-se sensíveis as drogas: cefepime, gentamicina, amicacina e levofloxacina; cefepime, cefotaxima, levofloxacina, piperacilina e sulfa-Trimetoprim; e gentamicina, amicacina, cefuroxima, cefepime, cefotaxima, levofloxacina e piperacilina, respectivamente. Caracterizando estas drogas como mais eficazes contra os isolados de amostras de *sashimi* de salmão.

Referências

1 Nespolo NM, Martineli TM, Rossi JR, OD. Microbiological Quality Of Salmon (*Salmo Salar*) Sold in Cities of The State of São Paulo, Brazil. Braz. J. of Microb. 2012; 43(4), 1393-1400.
2 Vallandro MJ. Avaliação da qualidade microbiológica de sashimis a base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa na cidade de Porto Alegre- RS. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010; Porto Alegre.
3 Franco BDGM, Landgraf M**.** Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Editora: Atheneu, 2008; 99.
4 Valente D, Passos ADC. Avaliação higiênico-sanitária e físico-estrutural dos supermercados de uma cidade do Sudeste do Brasil. Ver. Bras. Epidem. 2004; 7(1), 80-87 2004.
5 Hall, R. L. Food-borne illness: implications for the future. Emerg. Infect. Dis. 1997 Oct-Dec; 3(4):555-9.
6 Rawdkuen S, Suthuluk P, Kamhangwong D, Benjakul S. Mechanical, Physico-Chemical, and Antimicrobial Properties of Gelatin-Based Film Incorporated with Catechin-Lysozyme. Chem Cent J. 2012; 6: 131.

7 Chaudhury A, Nath G, Shukla BN, Sanyal SC. Biochemical characterization, enteropathogenicity and antimicrobial resistance plasmids of clinical and environmental *Aeromonas* isolates. J. of Med. Microb. 1996: 44(6):434-7.

8 Wolff MJ. Use and misuse of antibiotics in Latin America. Clin. Infect Dis 1993; 17 Suppl 2:S346-51.

9 Mota RA, Silva MFL, Porto WJN, Silva ALBG. Artigo de revisão: Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição à multirresistência bacteriana. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 2005; 42 (6), 465-470.

10 ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Antimicrobianos – Bases teóricas e uso clínico. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm>. Acesso em: jun 2016.

11 CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25, 2015; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

12 Mota LM, Vilar FC, Dias LBA, Nunes TF, Moriguti JC. Uso racional de antimicrobianos. Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. 2010; 43 (2), 164-72.

13 Vanderzant C, Splitt-Stoesser DF. Compendium of Methods for the microbiological. 1992; Examination of food, American Public Health Association.

14 Krumperman PH. Multiple Antibiotic Resistance Indexing of *Escherichia coli* to Identify High-Risk Sources of Fecal Contamination of Foods. Applied and environ. Microb. Jul. 1983; 165-70.

15 Smith PR, Breton AL, Horsberg TE, Corsin F. Guidelines for antimicrobial use in aquaculture. In: Guardabassi L, Jensen LB, Kruse H. (Ed.). Guide to antimicrobial use in animals. Oxford: WilleyBlackwell, 2008; 207-216.

16 Evangelista-Barreto NS, Pereira AF, Silva RAR, Ferreira LTB. Carne de siri como veículo na disseminação de enteropatógenos resistentes aos antimicrobianos. A. Acta Fish. 2013; 1(1).

17 Carvalho LR, Pinheiro BEC, Pereira SR, Borges MASF. Bactérias resistentes a antimicrobianos em amostras de água de coco comercializada em Itabuna, Bahia. Rev. Baiana Saúde Púb., 2012; 36(3): 751-763.

18 Radu S, Ahmad N, Ling FH, Reezal A. Prevalence and resistance to antibiotics for Aeromonas species from retail fish in Malasya. Int. J. Food Microb. 2003; 81(3), 261-6.

19 Kruse H, Sorum H. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. Appl. Env. Microb. 1994; 60(11), 4015-21.

20 Dias MT, Santos PCRF, Oliveira LAT, Marin VA. Avaliação da sensibilidade de cepas de *Escherichia coli* isoladas de mexilhões (*Perna perna* linnaeus, 1758) à antimicrobianos. Ciênc. Tec. Alim. Campinas abr-jun. 2010; 30(2): 319-324.

21 Jacobs L, Chenia HY. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. J. of Food Microb. 2007; 114 (3), 295–306.

22 Miranda CD, Zemelman R. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. The Science of the Total Environment. 2002. 293 (1-3), 207–218.

23 Ishida Y, Ahmed AM, Mahfouz NB, Kimura T, El-Khodery SA, Moawad AA, Shimamoto T. Molecular analysis of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria isolated from fish farms in Egypt. J. of Vet. Med. Sci. 2010; 72 (6), 727-734.

24 Peixoto, LJS; Sá, MCA; Gordiano, LA; Costa, MM. *Aeromonas* spp.: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. Arq. Inst. Biol. Jul-set. 2012; 79 (3), 453-461, 2012.
25 Pablos M, Rodríguez-Calleja JM, Santos JA, Otero A, García-López M-L. Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factors. Int. J. of Food Microb. 2009; 135 (2), 158–64.
26 Cabello FC. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Env. Microb. Jul. 2006; 8 (7), 1137–44.
27 Silva RML. Bactérias do gênero *Aeromonas* e indicadores de qualidade da água em pisciculturas da região da baixada ocidental maranhense. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2010.
28 Suhet MI, Schocken-Iturrino RP, Amaral LA. Atividade hemolítica e resistência a antimicrobianos por espécies de *Aeromonas* isoladas de criação intensiva de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Ars. Vet. 2011; 27 (1), 36-44.
29 Cereser ND. Perfil de resistência de *Aeromonas* spp. isolada no fluxograma de produção do queijo minas frescal industrial e artesanal. Ars. Vet. 2013; 29(1), 30-6.
30 Jacobs L, Chenia HY. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. J. of Food Microb. 2007; 114 (3), 295–306.
31 SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Aquicultura no Brasil: série de estudos mercadológicos. 2015, 71.
32 Buschmann AH, Tomova A, López A, Maldonado MA, Henríquez LA, Ivanova L, et al. Salmon Aquaculture and Antimicrobial Resistance in the Marine Env. Plos One. Aug. 2012; 7 (8).
33 Yano Y, Hamano K, Satomi M, Tsutsui I, Ban M, Aue-Umneoy D. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio* species related to food safety isolated from shrimp cultured at inland ponds in Thailand. Food Control 2014; 38, 30-6.
34 Adeleke, EO, Omafuvbe BO. Antibiotic resistance of aerobic mesophilic bacteria isolated from poultry faeces. Res. J. of Microb. 2011; 6 (4), 356-65.
35 Machado AL, Araújo RL, Souza OV, Vieira RHSF. Resistência antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* isoladas de pescado marinho comercializado na feira livre do Mucuripe Fortaleza-CE, Brasil. Bol. Inst. Pesca. 2015; 41(4), 931–43.
36 Cabello FC. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Env. Microb. 2006. Jul**;** 8(7), 1137–44.

CAPÍTULO IV

Artigo segundo as normas do Journal Food Control

Pesquisa de histamina em *sashimi* de salmão (*Salmo salar*) por cromatografia líquida de alta eficiência.

Karina Silva Cordeiro[1], Cáritas de Jesus Silva Mendonça[2], Isabel Azevedo Carvalho[1], Francisca Neide Costa[1]

[1] Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água – Universidade Estadual do Maranhão - Cidade Universitária Paulo VI - s/n - Tirirical - CEP. 65055-310 - São Luís/MA, Brasil.

[2] Universidade Federal do Maranhão, Pró - Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Av. dos Portugueses - 1966, Campus do Bacanga - Bacanga, - CEP. 65080-580 São Luís, MA Brasil.

Autor correspondente: Francisca Neide Costa, Universidade Estadual do Maranhão - Cidade Universitária Paulo VI - s/n - Tirirical - CEP. 65055-310 - São Luís/MA, Brasil. Telefone: +55 98 99159-4215.

Autor (a):

Karina Silva Cordeiro e-mail: karinascordeiro@outlook.com

Coautores:

Cáritas de Jesus Silva Mendonça, e-mail: mendoncacaritas@ig.com.br

Isabel Azevedo Carvalho, e-mail: isabel.azevedo@gmail.com

Francisca Neide Costa, e-mail: francisca.cca.uema@gmail.com

Resumo

A presença de bactérias histamina-positivas e a histamina nos alimentos refletem a conservação do alimento e a possibilidade de causa de intoxicação escombróide. Métodos de análises microbiológicas e um método de cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizado na determinação de histamina em *sashimi* de salmão (*Salmo salar*). Obtiveram-se: coliformes termotolerantes variaram de 0 a $\geq$ $2{,}4x10^2$ NMP/g, identificou-se de *E. coli* em 5% (3) e *Salmonella* sp. em 5% (3) das amostras. Os limites de concentração de histamina variaram de 44,06 $\pm$0,74 a 505,46 $\pm$8,83 mg/Kg de *sashimi* de salmão e 21 dessas amostras apresentaram concentração superior a 100mg/Kg. Conclui-se que as amostras analisadas apresentaram alta carga microbiana e elevadas concentrações de histamina, teoricamente capazes de causar sintomas de intoxicação escombróide, portanto consideradas preocupação a saúde dos consumidores.

Palavras-chave: Pescado cru; Segurança Alimentar; Histamina; Amina Biogênica

Compostos Químicos

Histamine - Pubchem CID: 774

Hydrochloric Acid - Pubchem CID: 313

Trichloroacetic Acid - Pubchem CID: 6421

Sodium Hydroxide – Pubchem CID 14798

Sodium Bicarbonate – Pubchem CID: 516892

L-Proline – Pubchem CID: 145742

Acetonitrile – Pubchem CID: 6342

Dansyl Chloride - Pubchem CID: 11801

Acetone – Pubchem CID: 180

Abreviaturas:

APHA	American Public Health Association
CV	Coeficiente de Variabilidade
FDA	Goof and Drug Administration
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HSTM	Histamina
INViC	Indol, Vermelho de metila, *Voges-Proskauer* e Citrato
LOD	Límite de Detecção
LOQ	Límite de Quantificação
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
NMP/g	Número Mais Provável por grama
PTFE	Politetrafluoretileno
SS	*Sashimi* de salmão (*Salmo salar*)
TCA	Ácido Tricloroacético

Financiamento

Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA - Edital nº 40/ 2015, pelo financiamento da pesquisa e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão de bolsa ao pesquisador.

1. Introdução

O consumo crescente de peixes crus tem sido evidenciado pelo surgimento de restaurantes especializados na culinária japonesa, comuns a bairros de classe elevada nas grandes cidades e contemporâneos de centros comerciais, na categoria de *fast-food* e modalidade *delivery* (Velloso, 2004). Contribuem ao aumento no consumo de peixes no país e aquecimento a indústria do pescado, sobretudo aquicultura, que nas últimas décadas (1980-2010) obteve taxa de crescimento mundial de 8,8% a/a. O consumo mundial per capita de peixe deverá atingir 19,6Kg em 2021, 16% acima da média nos anos de 2009 a 2011 (FAO, 2012).

O salmão – do atlântico e do pacífico - representa um dos peixes importados em maior volume pelo Brasil (SEBRAE, 2015). O Brasil ocupa o segundo lugar no *ranking* dos países importadores do salmão chileno, seguido pelos EUA e Japão. Diariamente, cerca de seis milhões de pessoas consomem o salmão chileno (Chandía, 2010).

O pescado possui grande importância na alimentação, especialmente por seu excelente valor nutricional. Entretanto, é um alimento extremamente susceptível à deterioração devido sua elevada atividade de água, riqueza de nutrientes, alto teor de gorduras insaturadas facilmente oxidáveis, e pH próximo da neutralidade (no máximo 6,8), pouco tecido conjuntivo, ação de enzimas endógenas - agentes de decomposição proteica, e ação microbiana (Brasil, 1994; Ogawa; Maia, 1999).

Novas tendências em segurança dos alimentos e consumidores criteriosos quanto a alimentação saudável e de qualidade têm impulsionado a busca de constituintes presentes nos alimentos que venham interferir da qualidade dos mesmos, com isso pesquisadores tem investido extensivamente em estudos que identifiquem substâncias nos alimentos que possam afetar a saúde humana (Prestes et al., 2006).

No processo deteriorativo de alimentos há a formação de histamina, uma amina biogênica não volátil, formadas como resultado da descarboxilação de histidina - aminoácido livre, resistente ao tratamento térmico e detectado em níveis baixos em pescado recém capturado (Pereira, 1997), e segundo Shalaby (1996) os alimentos susceptíveis de conter níveis elevados de aminas biogênicas incluem peixe e produtos de peixe, produtos lácteos, carne e produtos à base de carne e produtos fermentados.

A histamina é agente de intoxicação alimentar ou escombróide, resultante da descarboxilação de histidina por ação de enzimática, de origem bacteriana, principalmente Enterobacteriaceae (FAO, 2012). A *Food and Drug Administration* (FDA) estabelece o limite máximo de 50mg/Kg de histamina no peixe fresco. Nos países do MERCOSUL o nível máximo

permitido é de 100ppm no músculo nas espécies das famílias Scombridae, Scombresocidae, Clupeidae, Coryyphaenidae e Pomatomidae (Brasil, 1997).

No período de 2007 a 2010, o estado do Maranhão notificou apenas 24 surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), em que o agente etiológico foi isolado em 29,2% dos surtos notificados, sendo a *Salmonella* spp. identificadas em 3 surtos. Não foram identificados casos de intoxicação por escombrotoxina no período (Brasil, 2011).

As bactérias formadoras de histamina são capazes de produzi-la a várias temperaturas, principalmente > 21,1°C e particularmente acelerado a $\pm$ 32,2°C, no entanto, também podem produzir a $\geq$7,2ºC. Uma vez que a enzima descarboxilase de histidina está presente no peixe, pode continuar ativa, independente da presença da bactéria. A mesma é estável ao congelamento e pode ser reativada no descongelamento. A enzima é inativada pelo calor, assim como a bactéria, porém a histamina não, incluindo temperatura de esterilização, e se mantém estável sob congelamento. A histamina é um importante indicador de decomposição de peixes, em geral associada a alterações sensoriais (FDA, 2011).

A formação de histamina em tecidos de peixes é atribuída a diversos micro-organismos. Dentre estes as bactérias mesófilas são suas principais formadoras, capazes de produzir mais de 500 mg/Kg após 48h (Kim et al., 2001); no entanto, bactérias psicrófilas (*Photobacterium iliopiscarium*) são capazes de produzir níveis superiores a 500 mg/Kg a 5ºC /72h, 10ºC /36 h e 20ºC /18 h (Takahashi et al., 2015).

Os principais sintomas da intoxicação escombróide são resultantes da quantidade de histamina ingerida, sensibilidade individual e capacidade de desintoxicação do organismo. E ocorrem logo após o consumo (até 2h) e envolvem alterações no sistema cardiovascular, queimação na boca, urticária, rubor, cefaléia, secreção nasal, broncoespasmo, taquicardia, edema, prurido, náusea, vômito e diarreia (Lohiya et al., 2015; Hungerford, 2010).

Um relato de caso de escombrotoxinismo clássico, ocorrido nos Estados Unidos, consequente à ingestão de salmão, com apresentação imediata dos sinais e sintomas: queimação de boca, sensação de sufocamento, rubor facial, aperto no peito, tonturas e palpitações, foi diagnosticado em um atendimento de emergência como “reação alérgica” sem especificação de causa e cuja notificação ao departamento de saúde competente não foi realizada (Lohiya et al., 2015). Casos de escombrotoxinismo são muitas vezes diagnosticados como alergias de causas diversas e não associadas a consumo de alimentos.

A intoxicação por histamina é possivelmente o principal problema sanitário associado ao alto teor de aminas biogênicas em peixe. Peixes chamados de escombróides, como o atum, o bonito, a sarda, assim como espécies não escombróides, como sardinhas, anchova, arenque e

salmão, têm altos níveis de histidina em sua carne (Richard et al., 2008). Embora a intoxicação de histamina raramente ser fatal, a alta morbidade requer tratamentos médicos de emergência, por vezes internação hospitalar, o que gera custos elevados aos serviços de saúde, especialmente se envolverem muitas pessoas.

Na investigação de um surto alimentar, envolvendo sete vítimas que apresentaram sintomas alérgicos, confirmou-se intoxicação por ingestão de filé de peixe oriundo de um restaurante no sul de Taiwan, devido a detecção de concentrações iguais a 478 e 435 mg/Kg de histamina no alimento. De acordo com Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC 2000) a concentração de histamina a 200 mg/Kg pode ser suficiente para causar os sintomas de intoxicação escombróide (Chen et al., 2010).

A presença de histamina no pescado indica o grau de frescor do alimento e de acordo com Oliveira (2009) deve ter determinação realizada através da cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE. A CLAE tem sido a técnica mais comumente usada na separação e quantificação de substâncias (Aragão et al, 2009), como as aminas biogênicas.

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de identificar e quantificar histamina em amostras de s*ashimi* de Salmão (*Salmo salar*).

2. Materiais e métodos

2.1 Amostras

Foram obtidas 60 amostras de sashimi de salmão de restaurantes especializados, localizados no munícipio de São Luís – MA. Os restaurantes foram identificados a partir de listagem emitida pela Secretaria Municipal de Saúde – Coordenação de Vigilância Sanitária, destes foram selecionados 10 restaurantes especializados em culinária japonesa para a pesquisa, de acordo com a disponibilidade do produto *sashimi*. Identificados como: R1 a R10. O ensaio foi conduzido em arranjo fatorial 10x6 (dez estabelecimentos x seis períodos de amostragem).

2.2 Metodologia de análise de histamina

As amostras foram picadas e segregadas em porções de 25g recolhida em placa de Petri estéril, identificadas e congelada, para análise de histamina, de cada amostra.

A amina biogênica foi identificada e quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência, em equipamento HPLC Proeminence® (LC-10AT, SPD-M20A, CTO-20A, CBM-20A e DGU-20A_{5R}) (Shimatzu, Japão), cuja derivatização foi de acordo com a metodologia descrita por Ben-Gigirey et al. (1998), com adaptações. Para extração - As amostras avaliadas, foram descongeladas sob refrigeração e seguiu-se homogeneização sob equipamento tipo Turrax NT138 (Novatecnica, Brasil); do homogeneizado pesou-se 1,0g em balança analítica, sendo

transferido para tubo de polipropileno de 50mL. Adicionou-se 2,0mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5% mol/L (Dinâmica) e agitou-se em *vortex* por 1min. Submeteu-se a Centrifuga 420R (Hettich, Brasil) 6min, 4ºC e 11000rpm, retirou-se o sobrenadante para tubos de polipropileno 15mL.

Condições de derivatização. A 1ml de solução padrão de trabalho ou extrato de amostra adicionou-se 200µL de solução de hidróxido de sódio 2N, 300µL de uma solução saturada de bicarbonato de sódio e 1,5mL de solução de Cloreto de Dansila 7,5g/L (Dinâmica). Em seguida, colocou-se a mistura em banho de água a 40ºC por 45min, ao abrigo da luz. Após este tempo, adicionou-se 100µL de L-Prolina 100g/L. Após 30min ajustou-se o volume a 5ml com acetonitrila. Submeteu-se a Centrifuga 420R (Hettich, Brasil) 6min, 4ºC e 11000rpm. As soluções foram filtradas por unidade filtrante com membrana de PTFE, 0,45mm, com uso de seringa. Mantidas sob refrigeração até injeção do analito.

Preparação da solução mãe. Histamina $\geq$ 97% $C_5H_9N_3$ (Sigma Aldrich, EUA) de qualidade analítica, foi preparada a concentração de 1g/L em solução de Ácido Clorídrico (HCl) 0,1 mol/L (Dinâmica).

Soluções de trabalho. Foram preparadas a partir da solução mãe de histamina, nas concentrações: 1,0; 5,0; 25; 50; 100 e 150mg/L diluindo-se em solução de HCl 0,1 mol/L (Dinâmica) para volume final de 2mL, com injeções realizadas em triplicata.

Condições cromatográficas. A separação cromatográfica da amina biogênica foi realizada de acordo com os procedimentos da Normativa n.º 25 – MAPA (Brasil, 2001), com alterações. Utilizou-se equipamento HPLC Proeminence®, Software LC *Solution* (Shimadzu, Japão), detector UV- Vis PhotoDiode Array Detector (DAD) a 254nm, coluna de fase reversa Shim-Pack VP-ODS (250 x 4.6mm, 12nm, 4,6µm, 100Å), com *loop* de 20µL. As amostras foram eluídas com um gradiente de acordo com a Tabela A.1 e fase móvel Acetonitrila / Água, fluxo de 1mL/min, Pressão da Bomba em 50Kgf/cm^2 e temperatura do forno de 40ºC.

Tabela A.1: Gradiente de Eluição para análise de histamina.

Tempo (min)	Água (%)	Acetonitrila (%)
0.01	40	60
1.00	25	75
2.00	25	75
3.00	5	95
4.00	5	95
5.00	40	60
15.00	40	60

A identificação da histamina foi feita por comparação entre o tempo de retenção do padrão com tempo dos picos das amostras.

Parâmetros de estudo da curva - O método de quantificação de histamina em amostras de SS foi avaliado em termos dos parâmetros analíticos: linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). A análise das amostras foi realizada em duplicata.

A quantificação da histamina foi realizada através de padronização externa e o valor encontrado na amostra foi multiplicado pelo fator de correção, que foi calculado com base na recuperação do método. Para o cálculo de recuperação (%Rec) pesou-se duas porções de 1g de matriz branca para histamina, fortificando uma delas (Brasil, 2011) com alíquota de 1mL da solução padrão a 50 mg/L de histamina para atingir uma concentração de 50 mg/Kg (que corresponde ao ponto intermédio da curva de calibração 50 mg/L). Onde o %Rec corresponde a fórmula abaixo, em que C_1 é a concentração do analito na amostra não fortificada; C_2 concentração do analito na amostra fortificada; e C_3 concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

$\%Rec = (C_2 – C_1 / C_3) \times 100$

Os limites de quantificação e detecção foram calculados empregando-se o método baseado nos parâmetros da curva analítica, utilizando-se Planilha V (Ribeiro et al., 2008).

O Cálculo de concentração de histamina nas amostras analisadas foi realizado segundo a fórmula abaixo, onde C é a concentração do analito na amostra; L é a leitura do equipamento (em mg/Kg) baseada na curva analítica; D é o fator de diluição; e m é a massa da amostra (g)

$C = L \times D / m$

A leitura do equipamento baseada na curva (L) corresponde a fórmula abaixo, em que y é a área corrigida; a é a inclinação da curva analítica; e b é o intercepto na curva de calibração.

$(L = y – b / a)$

3. Resultados

3.1 Estudo da curva analítica

A curva analítica da histamina foi linear, com faixa de concentração do analito em 1,0 - 150,0 mg/L e coeficiente de determinação R^2= 0,9923. A equação da curva analítica foi:

y = 50250x + 254795 (Figura A.1).

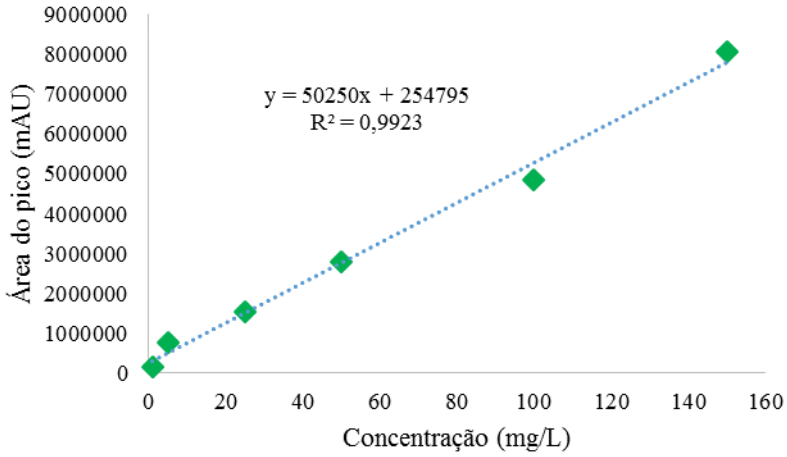

Figura B.1: Curva Analítica da solução padrão de histamina 1g/L em solução HCL 0,1mol/L.

A linearidade foi avaliada por meio de curvas de calibração utilizando seis pontos em triplicata por três dias consecutivos.

O Coeficiente de Variabilidade (CV) foi de 0,98%, para concentração nominal de 50 mg/L, cujo ensaio foi realizado em triplicata, com concentração média de 17,66 ±0,17.

Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) foram 26,09mg/Kg (95%) e 38,67mg/Kg (95%), respectivamente.

O Fator de recuperação foi igual a 45%.

O tempo de retenção foi de 9,7 minutos para a histamina e nenhum interferente foi detectado no tempo de retenção do analito em amostras brancas analisadas (n = 3) (Figura A.2). O método foi considerado eficiente para a separação da histamina.

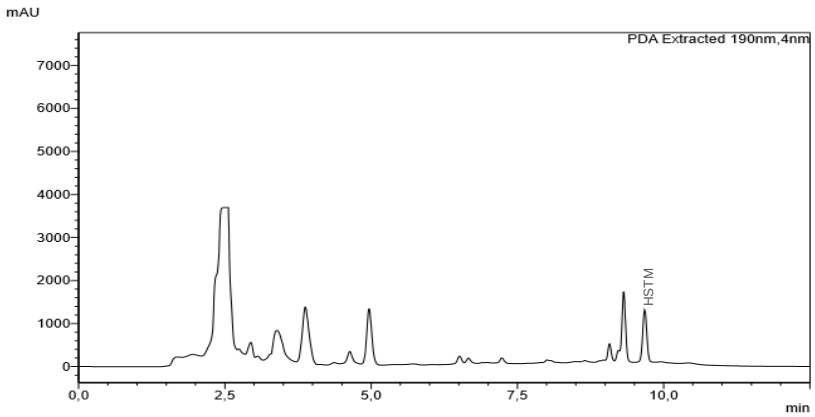

Figura B.2: Cromatograma de extrato de amostra de peixe com identificação de histamina.

Das 60 amostras analisadas, 47% (28) apresentaram concentrações de histamina detectáveis pelo método, com média de 208,78 mg/Kg, e 53% (32) apresentaram valores não detectáveis ao método (LQ <38,67mg/Kg). Dentre estas 35% (21) das amostras apresentaram concentrações maiores que o limite preconizado pela Normativa n.º 185, Ministério da

Agricultura (Brasil, 1997) e MERCOSUL, que é de 100mg/Kg; e 10% (6) com concentrações maiores que 50mg/Kg e menores que 100mg/Kg. Portanto 45% (27) das amostras apresentaram concentrações acima do limite preconizado pela FDA (2011), que é de 50mg/Kg; 55% (33) apresentaram teores de histamina não identificáveis; e em 1 amostra a histamina foi detectável, porém com concentração igual a 44,06 ±0,74, ou seja, menor que o limite preconizado pela FDA, conforme Tabela B.2.

Tabela B.2 - Níveis de histamina em amostras de sashimi de salmão (*Salmo* salar) de dez restaurantes de São luís – MA, 2017

Local de coleta	rA CA ± dp	rB CA ± dp	rC CA ± dp	rD CA ± dp	rE CA ± dp	rF CA ± dp
R1	Nd	137,85 ± 4,12	Nd	Nd	Nd	Nd
R2	114,46 ± 1,36	Nd	Nd	394,20 ± 22,56	374,68 ± 2,37	94,06 ± 2,60
R3	147,64 ± 2,90	Nd	Nd	102,53 ± 2,07	117,76 ± 3,07	157,63 ± 3,55
R4	339,33 ± 0,93	Nd	Nd	Nd	Nd	73,52 ± 3,62
R5	456,29 ± 3,71	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
R6	Nd	Nd	Nd	427,53 ± 4,26	Nd	Nd
R7	90,20± 1,81	Nd	Nd	124,75 ± 3,22	244,09 ± 9,27	Nd
R8	64,05 ± 0,91	78,59 ± 0,03	Nd	Nd	274,49 ± 3,66	338,89 ± 0,92
R9	Nd	316,59 ± 6,45	230,39 ± 5,01	182,89 ± 0,15	52,99 ± 1,85	44,06 ± 0,74
R10	Nd	175,36 ± 3,98	Nd	505,46 ± 8,83	323,48 ± 0,14	Nd

R: restaurantes, **r:** repetição, **CA:** concentração do analito, **dp:** desvio padrão, nd**:** não detectável

Os valores de coeficiente de variação encontrados nas amostras que apresentaram histamina detectável ao método, são mostrados na Tabela B.3. Com variação de 0,04 a 5,72%, com média de 1,93%.

Tabela B.3 – Coeficientes de variação (CV), segundo determinação de histamina das amostras de *sashimi* de salmão de dez restaurantes de São Luís - MA, 2017

Local de coleta	rA CV	rB CV	rC CV	rD CV	rE CV	rF CV
R1	nd	3,00	nd	Nd	Nd	Nd
R2	1,19	Nd	nd	5,72	0,63	2,77
R3	1,96	Nd	nd	2,02	2,61	2,25
R4	0,27	Nd	nd	Nd	Nd	4,93
R5	0,81	nd	nd	Nd	Nd	Nd
R6	nd	nd	nd	1,00	Nd	Nd
R7	2,01	nd	nd	2,58	3,8	Nd
R8	1,42	0,04	nd	Nd	1,33	0,27
R9	nd	2,04	2,18	0,08	3,49	1,69
R10	nd	2,27	nd	1,75	0,04	Nd

R: restaurantes, **r:** repetição, **CA:** concentração do analito,
nd: não detectável.

4. Discussão

.

A presença de bactérias histamina-positivas, como bactérias mesófilas, a exemplo enterobactérias, estão associadas a alimentos comercializados sob condições de higiene e

temperatura inadequadas. De acordo com Dalgaard (2006) e Brasil (2011) a multiplicação de bactérias do grupo dos coliformes é consideravelmente acelerada a temperatura ambiente e pode ter seu desenvolvimento impedido ou reduzido quando mantidos os alimentos à baixas temperaturas, ou seja, temperaturas <5ºC, garantindo a qualidade do produto durante sua exposição e venda.

A FDA (2011) recomenda o uso de temperaturas até 4,4°C para controle de produção histamina (escombrotoxina) nos alimentos. Haja vista, a ocorrência de produção de histamina, tanto a temperatura ambiente, quanto a temperaturas de refrigeração >5ºC, em especifico associada a presença de *Photobacterium s*pp. em alimentos. Pois segundo, Kanki et al. (2004) surtos de intoxicação por escombrotoxina têm sido associados à espécies do gênero *Photobacterium*. Portanto, a produção de histamina psicrotrófica consiste em preocupação na ocorrência de doença causada por escombrotoxina (Bjornsdottir-Butler et al, 2016).

Bactérias histamina-positivas multiplicam-se rapidamente a temperatura superiores a 20ºC, e apresentam temperatura ótima de crescimento a aproximadamente 32ºC (FDA, 2011; Souza et al., 2015). As avaliações de amostras de camarão de captura, em Salvador - BA, também mostraram associação de elevada contaminação por bactérias mesófilas e histamina-positivas à variação de temperatura de conservação do pescado (Andrade et al, 2008). O que consiste em preocupação a saúde pública.

A má conservação de alimentos crus prontos para consumo, como o *sashimi* de salmão, devidas a manutenção de temperaturas possivelmente superiores a 20ºC, com ausência de controle de tempo e temperatura desses alimentos e equipamentos que os contenha, pode configurar causa da presença de histamina no alimento. Da mesma forma, a exposição desses alimentos sem a devida proteção dos mesmos, como previsto na legislação vigente, podem interferir diretamente na quantidade de células bacterianas viáveis e consequente teor de histamina e possíveis surtos alimentares.

A contaminação de *sashimi* também pode ser influenciada pela inadequada manipulação, consequente de deficiente higiene dos manipuladores, falha ou ausência de higienização das mãos, e ainda contaminação cruzada, através de equipamentos e utensílios mal higienizados. Ressalta-se a necessidade de treinamento de manipuladores e controle de qualidade na produção de alimentos.

Souza et al. (2015) avaliando amostras de *sushi* em Joao Pessoa-PB, encontrou elevadas contagens de coliformes termotolerantes, porém numa porcentagem maior que a verificada no presente estudo, ou seja, 80% das amostras com valores acima de 10^2NMP/g. Salienta-se que

o crescimento deste subgrupo reflete a reduzida ou ausência de aplicação de boas práticas de produção de alimentos.

De acordo com os resultados para o teor de histamina nas amostras de *sashimi* de salmão, observou-se dentre as amostras, consideradas fora dos padrões definidos pelas legislações nacionais e internacionais, que as concentrações variam de 44,06 ±0,74 a 505,46 ±8,83 mg/Kg de alimento, considerando que 21 dessas amostras apresentaram concentração superior a 100mg/Kg, constatou-se que estes alimentos representam perigo a saúde de seus consumidores, podendo ser veiculador de escombrotoxina. Os resultados assemelham-se com os encontrados por Oliveira et al. (2004), que detectou teores de histamina em amostras de atum enlatado com variação de 1,57 a 1.023,16mg/kg.

Das amostras de *sashimi* de salmão analisadas 55% apresentaram teores de histamina não identificáveis, somado a 10% que apresentaram valores <100mg/kg, 65% das amostras foram consideradas próprias ao consumo humano, segundo Brasil (1997). Ressalta-se alguns casos de intoxicação alimentar causadas por ingestão de peixes com baixos teores de histamina, possivelmente pela presença de outras substâncias, potencialmente de tóxicas que podem estar envolvidas ao processo de deterioração do peixe e formação de toxinas no alimento.

A média de histamina nas 60 amostras de *sashimi* de salmão foi de 208,78 mg/Kg e destas 12 apresentaram teores de histamina iguais ou maiores que o dobro preconizado como limítrofe segundo Brasil (1997). O possível consumo dessas amostras poderia causar escombrotoxinismo em humanos, haja vista valores maiores que 200 mg/Kg como também referenciado por Chen et al. (2010). Associa-se as elevadas concentrações à condições higiênico-sanitárias inadequadas durante a manipulação do pescado e crescimento de bactérias em condições de armazenamento insatisfatórias.

Mesmo com o crescente consumo de preparações contento peixe cru, não tem sido observados dados referentes a intoxicação por escombrotoxina como causa de DTA nos relatórios de órgãos competentes, nos quais a relação na maioria dos casos está vinculada à salmoneloses, sendo, de acordo com Brasil (2012) a investigação do agente etiológico responsabilidade da equipe de Vigilância Epidemiológica em parceria com as áreas de Vigilância Sanitária, Vigilância Ambiental, Agricultura, Saneamento, Laboratório e outras quando necessário.

Observou-se no presente estudo %Rec igual a 45%, sendo o intervalo aceitável (80,0 – 110,0%) estabelecido pela Comunidade Européia, para concentrações ≥10 µg/kg (2002). Portanto, o %Rec encontrado estaria bem abaixo do esperado. A recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (Ribani et al., 2004).

Evangelista et al. (2015) em seu estudo de estabilidade das soluções estabeleceu prazos de validade de 30 dias para as soluções da fase móvel A, da solução TCA 5% e da solução derivante e de 150 dias para a solução padrão de histamina. Neste presente estudo, foram utilizadas soluções com prazos superiores aos referidos para soluções da fase móvel e solução de TCA, assim como solução padrão, embora armazenados sob refrigeração (4 a 10°C) em frasco de polietileno ou vidro âmbar, o que sugere este ter sido um forte interferente nos resultados encontrados para recuperação, salienta-se ainda que a prova de recuperação do analito em amostra branca foi realizado após análise de todas as amostras do estudo.

As alterações feitas no método de extração da histamina neste estudo, foram a substituição do ácido perclórico (Brasil, 2011) por Ácido Tricloroacético (TCA), pois de acordo com a EFSA (2011) o TCA tem sido o mais indicado para extração de aminas biogênicas em peixes, por ser rápido, simples, não ser explosivo e obter resultado favorável de recuperação, sendo a complexidade das matrizes alimentares uma consideração importante na obtenção de recuperações adequadas das aminas.

Foi acrescentado tempo de um minuto (total de 6min) e velocidade de centrifugação de 5000 rpm (total de 11000), para extração de histamina das amostras e manteve-se a temperatura da mesma (4ºC), em relação ao prescrito por Brasil (2011). De acordo com (Silva, 2008) as variáveis tempo e a temperatura de centrifugação, e sua interação, são positivas sobre o %Rec, em que a recuperação obtida é inversamente proporcional ao aumento do tempo e da temperatura de centrifugação. Indicando, Tempo de Centrifugação $\geq$3min, Velocidade de Centrifugação $\leq$11250 x g, Temperatura de Centrifugação próxima a 0°C, mas não menor que 0°C, como condição ótima para extração de histamina em pescado.

De acordo com Fidélis (2013), valores de %Rec encontrados fora desse intervalo aceitável apresentam possíveis causas: falha humana, troca de reagentes, contaminação de materiais e/ou problemas no equipamento de medição (perda de sensibilidade). Cujas ações requeridas são: Repetir a análise, permanecendo os resultados anteriores, corrigir o problema.

Possíveis falhas no método de extração de histamina, evidenciados pelo baixo percentual de recuperação da mesma nas amostras, sendo importante a repetição das análises com amostras semelhantes de pescado. Qualquer resultado de medição analítica está sujeito a desvios do valor verdadeiro devido a diversas razões, dentre elas pode-se citar: variação de temperatura em equipamentos volumétrico, reflexões e luz dispersa em instrumentos espectroscópios, interpretações individuais de analistas, recuperação incompleta de extração, são fontes de erros em potencial. Na medida do possível, tais erros devem ser minimizados por controle

externo ou corrigidos explicitamente, por exemplo, pela aplicação de um fator de correção (Baccan et al., 2003).

A obtenção de bons resultados analíticos implica, muitas vezes, em um processo prévio de extração e purificação dos analitos para que se promova a remoção de interferentes. A extração é uma etapa crucial na recuperação das aminas. Qualquer problema ocorrido nesta etapa pode resultar negativamente nos valores de recuperação (Önal, 2007).

No entanto, a variabilidade nos níveis de histamina, entre peixes e dentro de um peixe individual pode ser grande, mesmo em peixes do mesmo recipiente de colheita. Por este motivo a FDA (2011) estabeleceu o nível de 50mg/Kg ou PPM de histamina na porção comestível de peixe. Pois, se esta quantidade for encontrada, existe a possibilidade de outras em outras porções a concentração ultrapassar 500mg/Kg.

Os valores de coeficiente de variação encontrados segundo resultados detectáveis de histamina nas amostras apresentaram-se dentro do preconizado por Brasil (2011), que considera como adequado, valores de CV para concentrações entre 100 mg/kg e 1000 mg/kg, abaixo de 5,3%. Com exceção de uma das amostras que apresentou CV igual a 5,72%, esta alteração pode ser devida a falhas humana, haja vista a concentração de histamina da amostra correspondente ser de 394,20 $\pm$22,56, ou seja, elevado valor de desvio padrão para o resultado de histamina na amostra. Entretanto, segundo média de CV o dado pode ser considerado adequado ao método utilizado. De acordo com Brasil (2011), para ser considerado adequado, o CV para concentrações entre 100 mg/kg e 1000 mg/kg deve estar abaixo de 5,3%. Segundo Leite (2008) os valores iguais ou menores que 5% para coeficiente de variação ou desvio padrão relativo, são bons valores de reprodutibilidade.

Ainda que 65% do pescado sob sashimi de salmão tenha sido considerado de boa qualidade quanto aos teores de histamina, observou-se a necessidade de orientar os manipuladores e gestores de restaurantes quanto à manipulação do pescado, tanto no momento da compra, recebimento e armazenamento, quanto na forma de prevenir e melhorar as boas práticas de manipulação do pescado. Haja vista, obter-se valores elevados da histamina detectáveis pelo método nas amostras.

5. Conclusões

As amostras de *sashimi* de salmão analisadas apresentam elevadas concentrações de histamina, teoricamente capazes de causar sintomas de intoxicação escombróide, portanto consideradas preocupação a saúde dos consumidores.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Maranhão (FAPEMA), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Universidade Estadual do Maranhão (UEMA).

Referências

Andrade, C. S., Druzian, J. I., Leite, C. C., Carvalho Filho, C. D., Miranda, M. P. S., Macêdo, C. S., Guimarães, A. G. (2008). Determinação da microbiota histamina positiva em camarão. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 67(1):46-51.

Aragão, N. M., Veloso, M. C. C., Andrade, J. B. (2009). Validação de métodos cromatográficos de análise: um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da "Química Verde" na determinação de metilxantinas em bebidas. *Quím. Nova* [online]. 32(9), 2476-2481. oi.org/10.1590/S0100-40422009000900043.

Baccan, N., Andrade, J. C., Godinho, O. E. S., Barone, J.S. (2003) Química analítica quantitativa elementar. 3° ed. São Paulo. *EdgardBlücher*, 324.

Bjõrnsdóttir-Butler, K., Sanchez, L. M., Dunlap, P.V., Benner Jr, R.A. (2016). Draft genome sequences of histamine- and non-histamine-producing *Photobacterium* strains. *Genome Announc*, 4(5): e01008-16. Doi: 10.1128/genomeA.01008-16.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Integrado de Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos, Brasília, 2012.

Brasil. Secretaria Municipal de Saúde – SMS. Portaria n.º 2619/11 - Regulamento de Boas Práticas e de Controle de condições sanitárias e técnicas das atividades relacionadas à importação, exportação, extração, produção, manipulação, beneficiamento, acondicionamento, transporte, armazenamento, distribuição, embalagem, reembalagem, fracionamento, comercialização e uso de alimentos, águas minerais e de fontes, bebidas, aditivos e embalagens para alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil***,** Brasília, DF, 2011. Disponível em:<http://trinutri.com.br/portaria.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2015.

Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Decreto n.º 1.236, de 02 de setembro de 1994. Dá nova redação ao art. 507 do Decreto n° 30.691, de 29 de março de 1952, que regulamenta a Lei n° 1.283, de 18 de dezembro de 1950. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, DF, 11.nov. 1976. Disponível em: < http://www2.planalto.gov.br/ >. Acesso em: 10.jan. 2017.

Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, DF, 19.maio. 1997. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 10.jan. 2017.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 25, de 2 de junho de 2011. Aprova os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Pescado e seus Derivados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 3 de junho de 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC n.º 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, DF, 10. Jan. 2001. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 10.jan. 2017.

Chen, N, H. C., Lee, Y. C., Lin, C. M., Hwan, D.F., Tsai, Y.H. (2010). Determination of histamine and bacterial isolation in marlin fillets (Makaira nigricans) implicated in a

foodborne poisoning. *Journal of Food Safety*. Wiley Periodicals, Inc. Doi: 10.1111/j.1745-4565.2010.00234.x

Dalgaard P, Madsen HL, Samieian N, Emborg J. (2006). Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (Belone belone belone) – effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. *J Appl Microbiol*, 101(1): 80-95.

EFSA. European Food Safety Authority. (2011). Scientific opinion on rick basead controlo f biogenic amine formation in fermented foods. EFSAPanel on Biological Hazards (BIOHAZ). *EFSA Journal*, 9 (10), 2393.

Evangelista, W. P. (2015). Controle de qualidade do ensaio de histamina em pescado. (Tese do programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. Faculdade de Farmácia da UFMG. Belo Horizonte, MG.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture 2012. Rome: FAO, 2012. 209p.

FDA. Food and Drug Administration. Fish and fishery products hazards and controls guidance. 4 ed. Washington: Office of Seafood; 2011. Chap. 7. p.113-152.

Fidélis, G.C. (2013). Guia prático: controle estatístico de processo aplicado nas calibrações, medições e ensaios. Florianópolis, *CECT*.

Hungerford, J. M. (2010). Scombroid poisoning: A review. *Toxicon*. 56, 231-243.

Kanki M, Yoda T, Ishibashi M, Tsukamoto T. 2004. *Photobacterium phosphoreum* caused a histamine fish poisoning incident. Int J Food Microbiol 92:79–87. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.08.019.

Kim, S.H., Ben-Gigirey, B., Barros-Velázquez, J., Price, R.J.; An, H. Histamine and biogenic amine production by Morganella morganii isolated form temperature-abused albacore. Journal of Food Protection, v.63, n.2, p. 244-51, 2001.

Leite, F. (2008). Validação em análise química. 5° edição, *Editora Átomo*, Campinas.

Lohiya, G-S. Lohiya, Sapna, Lohiya, Sunita; Krishna, V. (2015). Scombrotoxinism: Protracted Illness following Misdiagnosis in the Emergency Department, *Case Reports in Emergency Medicine*, 2015.

MERCOSUL. Mercado Comum Sulamenricano. Recomendação N° 8/94 AR do Subgrupo de Trabalho n° 3, "Normas Técnicas". Resolução nº 40/1994.

Ogawa M, Maia ELM. Manual de Pesca – Ciência e Tecnologia do Pescado. São Paulo: Varela. 1999; 1: 453.

Oliveira, H. A. C., Silva, H. C. C., Sampaio, A. H., Viana, F. A., Saker-Sampaio, S. A. (2004) Determinação de histamina por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa em atum e sardinha enlatados. Revista Ciência Agronômica, Vol. 35, Número Especial, out.: 179 – 18.

Önal, A. (2007). A review: current analytical method for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemical*, 103, 1475-1486.

Pereira, K.C. Estudo Tecnológico de Conservação e Processamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*).1997. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis,1997.

Prester, L. (2011). Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review. Food Additives & Contaminants: part *A Chemistry, Analysis, Control*, Exposure and Risk Assessment, v. 28, n. 11, p. 1547-1560.

Ribani M., Bottoli C.B.G., Collins C.H., Jardim I.C.S.F., Melo L.F.C., Validação em métodos cromatográficos e electroforéticos, Quim. Nova 27 (2004) 771-780.

Ribeiro, F. A. L., Ferreira, M. M. C., Morano, S. C., Silva, L. R., & Schneider, R. P. (2008). Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Quim. Nova*, 31 (1), 164-171.

Richard, N.; Pivarnik, L.; Ellis, P. C.; Lee, C. Effect of matrix on recovery of biogenic amines in fish. *Journal of AOAC International*, v. 91, n. 4, p. 768-776, 2008.

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Aquicultura no Brasil: série de estudos mercadológicos. 2015, 71.

Shalaby, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, v. 29, n. 7, p. 675-690, 1996.

Silva, T.M. Otimização e validação de método para determinação de histamina em pescado. 2008. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

Souza, T. J. F. F., Silva, J. N., Silva Filho, C. R. M., Santos, J. G. (2015). Micro-organismos de interesse sanitário em sushis Microrganisms of sanitary interest in sushi. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 74(3):274-279.

Takahashi, H., Ogai, M., Miya, S., Kuda, T., Kimura, B. (2015). Effects of environmental factors on histamine prouction in the psychrophilic histamine-producing bacterium Phhotobacterium iliopiscarium. *Food Control* 52, 39-42.

Velloso EA. (2004). Avaliação sensorial e físico-química de filés de tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*) refrigerados e submetidos à radiação gama. 2004: 68. (Monografia em Especialização em Irradiação de Alimentos) - Universidade Federal Fluminense, Niterói.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As informações obtidas podem embasar novos estudos e criação de normas e padrões de controle e fiscalização desses serviços e produtos, melhorando as condições de avaliação e consumo das preparações de origem japonesa comercializadas na cidade de São Luís. Em vista de aprimoramento de políticas de Saúde Públicas na área de controle de qualidade de alimentos de origem animal.

A vigilância microbiológica regular de *sashimi* e outras preparações pode ajudar ao público em geral a compreender o nível de risco a que estão submetidos, indicando a qualidade do produto de consumo. Externando a preocupação da comunidade acadêmica da área de saúde, assim como a atuação profissional, com vista a supervisão, controle, participação de entidades governamentais e outros, com a finalidade de evitar ou minimizar a contaminação de alimentos por micro-organismos deterioradores e/ou bactérias patogênicas que podem causar danos à a saúde dos consumidores.

Considerando a legislação brasileira, direcionada a pratos prontos para consumo a base de carnes, pescados e similares crus (quibe cru, *carpaccio, sushi, sashimi*, etc.) e aspectos referentes aos resultados encontrados neste trabalho, em comparação a outros, questiona-se o padrão adotado no Brasil, em vista dos riscos decorrentes ao consumo deste alimento. A exemplo dos padrões sanitários adotados em outros países, como Taiwan, que legitima limites rigorosos, dentre eles coliformes a 35ºC e 45ºC a valores <0,3x10 NMP/g, assim como ausência de *E. coli* para produtos à base de pescado cru (FSS, 1993), em contrapartida no Brasil são permitidos valores $<10^2$ e não há especificação para *E. coli* (RDC n° 12/01). Sugere-se a possibilidade de legislação específica para pescado consumido cru e/ou aprimoramento ou ampliação da legislação existente no Brasil. A contar pelo consumo popularizado atual.

Destaca-se ainda a necessidade do acompanhamento e controle dos animais, nos locais de produção, como a monitorização do ambiente aquático, procedimentos de manejo, captura dos peixes e rigorosa fiscalização do produto importado, nos portos de recebimento.

ANEXOS

1. DIRETRIZES PARA AUTORES DA REVISTA DE SAUDE PÚBLICA

Devem ser digitados em extensão .doc, .txt ou .rtf, com letras arial, corpo 12, página em tamanho A-4, incluindo resumos, agradecimentos, referências e tabelas.
Todas as páginas devem ser numeradas.
Deve-se evitar no texto o uso indiscriminado de siglas, excetuando as já conhecidas.
Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados. Para tanto os autores devem explicitar em Métodos que a pesquisa foi conduzida dentro dos padrões exigidos pela Declaração de Helsinque e aprovada pela comissão de ética da instituição onde a pesquisa foi realizada.
Idioma
Aceitam-se manuscritos nos idiomas português, espanhol e inglês. Para aqueles submetidos em português oferece-se a opção de tradução do texto completo para o inglês e a publicação adicional da versão em inglês em meio eletrônico. Independentemente do idioma empregado, todos manuscritos devem apresentar dois resumos, sendo um em português e outro em inglês. Quando o manuscrito for escrito em espanhol, deve ser acrescentado um terceiro resumo nesse idioma.
Dados de identificação
a) Título do artigo - deve ser conciso e completo, limitando-se a 93 caracteres, incluindo espaços. Deve ser apresentada a versão do título em inglês.
b) Título resumido - com até 45 caracteres, para fins de legenda nas páginas impressas.
c) Nome e sobrenome de cada autor, seguindo formato pelo qual é indexado.
d) Instituição a que cada autor está afiliado, acompanhado do respectivo endereço (uma instituição por autor).
e) Nome e endereço do autor responsável para troca de correspondência.
f) Se foi subvencionado, indicar o tipo de auxílio, o nome da agência financiadora e o respectivo número do processo.
g) Se foi baseado em tese, indicar o nome do autor, título, ano e instituição onde foi apresentada.
h) Se foi apresentado em reunião científica, indicar o nome do evento, local e data da realização.
Descritores - Devem ser indicados entre 3 e 10, extraídos do vocabulário "Descritores em Ciências da Saúde" (DeCS), quando acompanharem os resumos em português, e do Medical Subject Headings (MeSH), para os resumos em inglês. Se não forem encontrados descritores disponíveis para cobrirem a temática do manuscrito, poderão ser indicados termos ou expressões de uso conhecido.
Agradecimentos - Devem ser mencionados nomes de pessoas que prestaram colaboração intelectual ao trabalho, desde que não preencham os requisitos para participar da autoria. Deve haver permissão expressa dos nomeados (ver documento Responsabilidade pelos Agradecimentos). Também podem constar desta parte agradecimentos a instituições quanto ao apoio financeiro ou logístico.
Referências - As referências devem ser ordenadas alfabeticamente, numeradas e normalizadas de acordo com o estilo Vancouver. Os títulos de periódicos devem ser referidos de forma abreviada, de acordo com o Index Medicus, e grafados no formato itálico. No caso de publicações com até 6 autores, citam-se todos; acima de 6, citam-se os seis primeiros, seguidos da expressão latina "et al".
Citação no texto: Deve ser indicado em expoente o número correspondente à referência listada. Deve ser colocado após a pontuação, nos casos em que se aplique. Não devem ser utilizados parênteses, colchetes e similares. O número da citação pode ser acompanhado ou não do(s) nome(s) do(s) autor(es) e ano de publicação. Se forem citados dois autores, ambos são ligados pela conjunção "e"; se forem mais de dois, cita-se o primeiro autor seguido da expressão "et al".

Exemplos:
Segundo Lima et al9 (2006), a prevalência se transtornos mentais em estudantes de medicina é maior do que na população em geral.
Parece evidente o fracasso do movimento de saúde comunitária, artificial e distanciado do sistema de saúde predominante.12,15
A exatidão das referências constantes da listagem e a correta citação no texto são de responsabilidade do(s) autor(es) do manuscrito.
Tabelas - Devem ser apresentadas separadas do texto, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. A cada uma deve-se atribuir um título breve, não se utilizando traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título. Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização da revista que a publicou, por escrito, para sua reprodução. Esta autorização deve acompanhar o manuscrito submetido à publicação
Quadros são identificados como Tabelas, seguindo uma única numeração em todo o texto.
Figuras - As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos, etc.), devem ser citadas como figuras. Devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto; devem ser identificadas fora do texto, por número e título abreviado do trabalho; as legendas devem ser apresentadas ao final da figura; as ilustrações devem ser suficientemente claras para permitir sua reprodução, com resolução mínima de 300 dpi. Não se permite que figuras representem os mesmos dados de Tabela. Não se aceitam gráficos apresentados com as linhas de grade, e os elementos (barras, círculos) não podem apresentar volume (3-D). Figuras coloridas são publicadas excepcionalmente. Nas legendas das figuras, os símbolos, flechas, números, letras e outros sinais devem ser identificados e seu significado esclarecido. Se houver figura extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização, por escrito, para sua reprodução. Estas autorizações devem acompanhar os manuscritos submetidos à publicação.
Submissão online
A entrada no sistema é feita pela página inicial do site da RSP (www.rsp.fsp.usp.br), no menu do lado esquerdo, selecionando-se a opção "submissão de artigo". Para submeter o manuscrito, o autor responsável pela comunicação com a Revista deverá cadastrar-se. Após efetuar o cadastro, o autor deve selecionar a opção "submissão de artigos" e preencher os campos com os dados do manuscrito. O processo de avaliação pode ser acompanhado pelo status do manuscrito na opção "consulta/ alteração dos artigos submetidos". Ao todo são oito situações possíveis:

- Aguardando documentação: Caso seja detectada qualquer falha ou pendência, inclusive se os documentos foram anexados e assinados, a secretaria entra em contato com o autor. Enquanto o manuscrito não estiver de acordo com as Instruções da RSP, o processo de avaliação não será iniciado.
- Em avaliação na pré-análise: A partir deste status, o autor não pode mais alterar o manuscrito submetido. Nesta fase, o editor pode recusar o manuscrito ou encaminhá-lo para a avaliação de relatores externos.
- Em avaliação com relatores: O manuscrito está em processo de avaliação pelos relatores externos, que emitem os pareceres e os enviam ao editor.
- Em avaliação com Editoria: O editor analisa os pareceres e encaminha o resultado da avaliação ao autor.
- Manuscrito com o autor: O autor recebe a comunicação da RSP para reformular o manuscrito e encaminhar uma nova versão.
- Reformulação: O editor faz a apreciação da nova versão, podendo solicitar novos esclarecimentos ao autor.

- Aprovado
- Reprovado

Além de acompanhar o processo de avaliação na página de "consulta/ alteração dos artigos submetidos", o autor tem acesso às seguintes funções:
"Ver": Acessar o manuscrito submetido, mas sem alterá-lo.
"Alterar": Corrigir alguma informação que se esqueceu ou que a secretaria da Revista solicitou. Esta opção funcionará somente enquanto o status do manuscrito estiver em "aguardando documentação".
"Avaliações/comentários": Acessar a decisão da Revista sobre o manuscrito.
"Reformulação": Enviar o manuscrito corrigido com um documento explicando cada correção efetuada e solicitado na opção anterior.
Verificação dos itens exigidos na submissão:
1. Nomes e instituição de afiliação dos autores, incluindo e-mail e telefone.
2. Título do manuscrito, em português e inglês, com até 93 caracteres, incluindo os espaços entre as palavras.
3. Título resumido com 45 caracteres, para fins de legenda em todas as páginas impressas.
4. Texto apresentado em letras Arial, corpo 12, em formato Word ou similar (doc,txt,rtf).
5. Nomes da agência financiadora e números dos processos.
6. No caso de artigo baseado em tese/dissertação, indicar o nome da instituição e o ano de defesa.
7. Resumos estruturados para trabalhos originais de pesquisa, português e inglês, e em espanhol, no caso de manuscritos nesse idioma.
8. Resumos narrativos originais para manuscritos que não são de pesquisa nos idiomas português e inglês, ou em espanhol nos casos em que se aplique.
9. Declaração, com assinatura de cada autor, sobre a "responsabilidade de autoria"
10. Declaração assinada pelo primeiro autor do manuscrito sobre o consentimento das pessoas nomeadas em Agradecimentos.
11. Documento atestando a aprovação da pesquisa por comissão de ética, nos casos em que se aplica. Tabelas numeradas sequencialmente, com título e notas, e no máximo com 12 colunas.
12. Figura no formato: pdf, ou tif, ou jpeg ou bmp, com resolução mínima 300 dpi; em se tratando de gráficos, devem estar em tons de cinza, sem linhas de grade e sem volume.
13. Tabelas e figuras não devem exceder a cinco, no conjunto.
14. Permissão de editores para reprodução de figuras ou tabelas já publicadas.
15. Referências normalizadas segundo estilo Vancouver, ordenadas alfabeticamente pelo primeiro autor e numeradas, e se todas estão citadas no texto.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

ISSN: 1518-8787

2. INSTRUÇÕES PARA AUTORES – ENVIO DE ARTIGOS SEGUNDO CADERNOS DE SAÚDE PÚBLICA/REPORTS IN PUBLIC HEALTH (CSP)

- Artigo

Resultado de pesquisa de natureza empírica (máximo de 6.000 palavras e 5 ilustrações). Dentro dos diversos tipos de estudos empíricos, apresentamos dois exemplos: artigo de pesquisa etiológica na epidemiologia e artigo utilizando metodologia qualitativa;

A CSP publica somente artigos inéditos e originais, e que não estejam em avaliação em nenhum outro periódico simultaneamente. Os autores devem declarar essas condições no processo de submissão. Caso seja identificada a publicação ou submissão simultânea em outro periódico o artigo será desconsiderado. A submissão simultânea de um artigo científico a mais de um periódico constitui grave falta de ética do autor.

Não há taxas para submissão e avaliação de artigos.

Serão aceitas contribuições em Português, Inglês ou Espanhol.

Notas de rodapé, de fim de página e anexos não serão aceitos.

A contagem de palavras inclui somente o corpo do texto e as referências bibliográficas, conforme item 12.13.

Todos os autores dos artigos aceitos para publicação serão automaticamente inseridos no banco de consultores de CSP, se comprometendo, portanto, a ficar à disposição para avaliarem artigos submetidos nos temas referentes ao artigo publicado.

- Fontes de financiamento

Os autores devem declarar todas as fontes de financiamento ou suporte, institucional ou privado, para a realização do estudo.

Fornecedores de materiais ou equipamentos, gratuitos ou com descontos, também devem ser descritos como fontes de financiamento, incluindo a origem (cidade, estado e país).

No caso de estudos realizados sem recursos financeiros institucionais e/ou privados, os autores devem declarar que a pesquisa não recebeu financiamento para a sua realização.

- Conflito de interesses

Os autores devem informar qualquer potencial conflito de interesse, incluindo interesses políticos e/ou financeiros associados a patentes ou propriedade, provisão de materiais e/ou insumos e equipamentos utilizados no estudo pelos fabricantes.

- Colaboradores

Devem ser especificadas quais foram as contribuições individuais de cada autor na elaboração do artigo.

Lembramos que os critérios de autoria devem basear-se nas deliberações do ICMJE, que determina o seguinte: o reconhecimento da autoria deve estar baseado em contribuição substancial relacionada aos seguintes aspectos: 1. Concepção e projeto ou análise e interpretação dos dados; 2. Redação do artigo ou revisão crítica relevante do conteúdo intelectual; 3. Aprovação final da versão a ser publicada; 4. Ser responsável por todos os aspectos do trabalho na garantia da exatidão e integridade de qualquer parte da obra. Essas quatro condições devem ser integralmente atendidas.

Os autores mantêm o direito autoral da obra, concedendo à publicação Cadernos de Saúde Pública, o direito de primeira publicação.

- Agradecimentos

Possíveis menções em agradecimentos incluem instituições que de alguma forma possibilitaram a realização da pesquisa e/ou pessoas que colaboraram com o estudo, mas que não preencheram os critérios para serem coautores.

- Referências

As referências devem ser numeradas de forma consecutiva de acordo com a ordem em que forem sendo citadas no texto. Devem ser identificadas por números arábicos sobrescritos (p.

ex.: Silva 1). As referências citadas somente em tabelas e figuras devem ser numeradas a partir do número da última referência citada no texto. As referências citadas deverão ser listadas ao final do artigo, em ordem numérica, seguindo as normas gerais dos (Requisitos Uniformes para Manuscritos Apresentados a Periódicos Biomédicos). Não serão aceitas as referências em nota de rodapé ou fim de página.
Todas as referências devem ser apresentadas de modo correto e completo. A veracidade das informações contidas na lista de referências é de responsabilidade do(s) autor(es).
No caso de usar algum software de gerenciamento de referências bibliográficas (p. ex.: EndNote), o(s) autor(es) deverá(ão) converter as referências para texto.

- Nomenclatura

Devem ser observadas as regras de nomenclatura zoológica e botânica, assim como abreviaturas e convenções adotadas em disciplinas especializadas.

- Processo de submissão online

Os artigos devem ser submetidos eletronicamente por meio do sítio do Sistema de Avaliação e Gerenciamento de Artigos (SAGAS), disponível em: http://cadernos.ensp.fiocruz.br/csp/index.php.
Outras formas de submissão não serão aceitas. As instruções completas para a submissão são apresentadas a seguir. No caso de dúvidas, entre em contado com o suporte sistema SAGAS pelo e-mail: csp-artigos@ensp.fiocruz.brcsp-artigos@ensp.fiocruz.br.
Inicialmente o autor deve entrar no sistema SAGAS. Em seguida, inserir o nome do usuário e senha para ir à área restrita de gerenciamento de artigos. Novos usuários do sistema SAGAS devem realizar o cadastro em "Cadastre-se" na página inicial. Em caso de esquecimento de sua senha, solicite o envio automático da mesma em "Esqueceu sua senha? Clique aqui".
Para novos usuários do sistema SAGAS. Após clicar em "Cadastre-se" você será direcionado para o cadastro no sistema SAGAS. Digite seu nome, endereço, e-mail, telefone, instituição.

- Envio do artigo

– A submissão on-line é feita na área restrita de gerenciamento de artigos http://cadernos.ensp.fiocruz.br/csp/index.php. O autor deve acessar a "Central de Autor" e selecionar o link "Submeta um novo artigo".
– A primeira etapa do processo de submissão consiste na verificação às normas de publicação de CSP. O artigo somente será avaliado pela Secretaria Editorial de CSP se cumprir todas as normas de publicação.
– Na segunda etapa são inseridos os dados referentes ao artigo: título, título resumido, área de concentração, palavras-chave, informações sobre financiamento e conflito de interesses, resumos e agradecimentos, quando necessário. Se desejar, o autor pode sugerir potenciais consultores (nome, e-mail e instituição) que ele julgue capaz de avaliar o artigo.
– O título completo (no idioma original do artigo) deve ser conciso e informativo, e conter, no máximo, 150 caracteres com espaços.
– O título resumido poderá ter máximo de 70 caracteres com espaços.
– As palavras-chave (mínimo de 3 e máximo de 5 no idioma original do artigo) devem constar na base da Biblioteca Virtual em Saúde BVS.
– Resumo. Com exceção das contribuições enviadas às seções Resenha, Cartas ou Perspectivas, todos os artigos submetidos deverão ter resumo no idioma original do artigo, podendo ter no máximo 1.700 caracteres com espaço. Visando ampliar o alcance dos artigos publicados, CSP publica os resumos nos idiomas português, inglês e espanhol. No intuito de garantir um padrão de qualidade do trabalho, oferecemos gratuitamente a tradução do resumo para os idiomas a serem publicados. Não se aceitam equações e caracteres especiais (por ex: letras gregas, símbolos) no resumo.

– Como o resumo do artigo alcança maior visibilidade e distribuição do que o artigo em si, indicamos a leitura atenta da recomendação específica para sua elaboração. (leia mais – link resumo)
– Agradecimentos. Possíveis agradecimentos às instituições e/ou pessoas poderão ter no máximo 500 caracteres com espaço.
– Na terceira etapa são incluídos o(s) nome(s) do(s) autor(es) do artigo, respectiva(s) instituição(ões) por extenso, com endereço completo, telefone e e-mail, bem como a colaboração de cada um. O autor que cadastrar o artigo automaticamente será incluído como autor de artigo. A ordem dos nomes dos autores deve ser a mesma da publicação.
– Na quarta etapa é feita a transferência do arquivo com o corpo do texto e as referências.
– O arquivo com o texto do artigo deve estar nos formatos DOC (Microsoft Word), RTF (Rich Text Format) ou ODT (Open Document Text) e não deve ultrapassar 1MB.
– O texto deve ser apresentado em espaço 1,5cm, fonte Times New Roman, tamanho 12.
– O arquivo com o texto deve conter somente o corpo do artigo e as referências bibliográficas. Os seguintes itens deverão ser inseridos em campos à parte durante o processo de submissão: resumos; nome(s) do(s) autor(es), afiliação ou qualquer outra informação que identifique o(s) autor(es); agradecimentos e colaborações; ilustrações (fotografias, fluxogramas, mapas, gráficos e tabelas).
– Na quinta etapa são transferidos os arquivos das ilustrações do artigo (fotografias, fluxogramas, mapas, gráficos e tabelas), quando necessário. Cada ilustração deve ser enviada em arquivo separado clicando em "Transferir".
– Ilustrações. O número de ilustrações deve ser mantido ao mínimo, conforme especificado no item 1 (fotografias, fluxogramas, mapas, gráficos e tabelas).
– Os autores deverão arcar com os custos referentes ao material ilustrativo que ultrapasse esse limite.
– Os autores devem obter autorização, por escrito, dos detentores dos direitos de reprodução de ilustrações que já tenham sido publicadas anteriormente.
– Tabelas. As tabelas podem ter até 17cm de largura, considerando fonte de tamanho 9. Devem ser submetidas em arquivo de texto: DOC (Microsoft Word), RTF (Rich Text Format) ou ODT (Open Document Text). As tabelas devem ser numeradas (algarismos arábicos) de acordo com a ordem em que aparecem no texto, e devem ser citadas no corpo do mesmo. Cada dado na tabela deve ser inserido em uma célula separadamente, e dividida em linhas e colunas.
– Figuras. Os seguintes tipos de figuras serão aceitos por CSP: Mapas, Gráficos, Imagens de Satélite, Fotografias e Organogramas, e Fluxogramas.
– Os mapas devem ser submetidos em formato vetorial e são aceitos nos seguintes tipos de arquivo: WMF (Windows MetaFile), EPS (Encapsuled PostScript) ou SVG (Scalable Vectorial Graphics). Nota: os mapas gerados originalmente em formato de imagem e depois exportados para o formato vetorial não serão aceitos.
– Os gráficos devem ser submetidos em formato vetorial e serão aceitos nos seguintes tipos de arquivo: XLS (Microsoft Excel), ODS (Open Document Spreadsheet), WMF (Windows MetaFile), EPS (Encapsuled PostScript) ou SVG (Scalable Vectorial Graphics).
– As imagens de satélite e fotografias devem ser submetidas nos seguintes tipos de arquivo: TIFF (Tagged Image File Format) ou BMP (Bitmap). A resolução mínima deve ser de 300dpi (pontos por polegada), com tamanho mínimo de 17,5cm de largura. O tamanho limite do arquivo deve ser de 10Mb.
– Os organogramas e fluxogramas devem ser submetidos em arquivo de texto ou em formato vetorial e são aceitos nos seguintes tipos de arquivo: DOC (Microsoft Word), RTF (Rich Text Format), ODT (Open Document Text), WMF (Windows MetaFile), EPS (Encapsuled PostScript) ou SVG (Scalable Vectorial Graphics).

– As figuras devem ser numeradas (algarismos arábicos) de acordo com a ordem em que aparecem no texto, e devem ser citadas no corpo do mesmo.
– Títulos e legendas de figuras devem ser apresentados em arquivo de texto separado dos arquivos das figuras.
– Formato vetorial. O desenho vetorial é originado a partir de descrições geométricas de formas e normalmente é composto por curvas, elipses, polígonos, texto, entre outros elementos, isto é, utilizam vetores matemáticos para sua descrição.
– Finalização da submissão. Ao concluir o processo de transferência de todos os arquivos, clique em "Finalizar Submissão".
– Confirmação da submissão. Após a finalização da submissão o autor receberá uma mensagem por e-mail confirmando o recebimento do artigo pelos CSP. Caso não receba o e-mail de confirmação dentro de 24 horas, entre em contato com a secretaria editorial de CSP por meio do e-mail: csp-artigos@ensp.fiocruz.brcsp-artigos@ensp.fiocruz.br.

3. INTRUÇÕES DE PUBLICAÇÃO SEGUNDO A REVISTA FOOD CONTROL (Texto traduzido)

A Food Control é uma revista internacional que fornece informações essenciais para as pessoas envolvidas na segurança alimentar e controle do processo. Inclui trabalhos originais de investigação, revisões oficiais, comunicações curtas, comentam os artigos que relatam sobre os novos desenvolvimentos em controle de alimentos e documentos de posição.
O trabalho descrito deve ser inovador na abordagem ou nos métodos utilizados. A importância dos resultados para a comunidade científica ou para a indústria alimentar também deve ser especificada. As contribuições que não cumpram estes requisitos não serão consideradas para revisão e publicação.

Tipos de papel
- Documentos de pesquisa originais de alta qualidade (preferencialmente não mais de 7000 palavras, incluindo tabelas e ilustrações).
- Artigos principais de revisão, até 10.000 palavras
- Comunicações curtas de até 3000 palavras (sem incluir referências), descrevendo trabalhos que podem ser preliminares, mas que merecem publicação imediata.
- Breve resenha sobre temas atuais, até 6000 palavras.
- Artigos de comentário que não excedam 2000 palavras.
- Documentos de posição de grupos de peritos são também bem-vindos.

Detalhes de Contato para a submissão
A submissão a esta revista procede totalmente online. Use as seguintes diretrizes para preparar seu artigo. Através da página inicial da revista http://ees.elsevier.com/foodcont você será guiado passo a passo através da criação e upload de vários arquivos.

Lista de verificação Submission
Você pode usar essa lista para realizar uma verificação final de sua submissão antes de enviá-lo para a revista para revisão. Consulte a seção relevante neste Guia para Autores para obter mais detalhes.
Certifique-se de que os seguintes itens estejam presentes:
Um autor foi designado como o autor correspondente com detalhes de contato:
• E-mail
• Endereço postal completo
Todos os arquivos necessários foram carregados:
Manuscrito:
• Incluir palavras-chave
• Todas as figuras (incluir legendas relevantes)
• Todas as tabelas (incluindo títulos, descrição, notas de rodapé)
• Certifique-se de todas as citações figuras e tabelas no texto coincidir com os arquivos fornecidos
• Indique claramente se a cor deve ser utilizado para quaisquer números em impressão gráfica Abstracts / Destaques arquivos (quando aplicável) e arquivos complementares (quando aplicável)

Estrutura do artigo
<u>Seções numeradas</u>
Divida seu artigo em seções bem definidas e numeradas. As subsecções devem ser numeradas 1.1 (em seguida, 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (o resumo não está incluído na numeração da

secção). Use esta numeração também para referências cruzadas internas: não se refira apenas ao "texto". Qualquer subsecção pode receber um breve cabeçalho. Cada título deve aparecer em sua própria linha separada.

Introdução

Estado os objetivos do trabalho e fornecer uma base adequada, evitando-se uma pesquisa bibliográfica detalhada ou um resumo dos resultados.

Material e métodos

Fornece detalhes suficientes para permitir que o trabalho a ser reproduzida. Os métodos já publicados devem ser indicados por uma referência: apenas devem ser descritas modificações relevantes.

Cálculo Teoria /secção

A teoria deve estender-se, não repetir, o fundo para o artigo já tratada na Introdução e estabelecer as bases para a continuação dos trabalhos. Em contraste, uma seção de Cálculo representa um desenvolvimento prático a partir de uma base teórica.

Resultados

Os resultados devem ser claros e concisos.

Discussão

Este deve explorar o significado dos resultados do trabalho, não repetir. Uma seção combinada de Resultados e Discussão é freqüentemente apropriada. Evite citações extensas e discussão da literatura publicada.

Conclusões

As principais conclusões do estudo podem ser apresentadas em uma seção conclusões curtas, o que pode ficar sozinho ou formar uma subseção de um Discussão ou Resultados e Discussão seção.

Anexos

Se houver mais de um apêndice, que deve ser identificado como A, B, etc.

Fórmulas e equações em apêndices deve ser dada numeração separada: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; Em um apêndice posterior, a Eq. (B.1) e assim por diante. Da mesma forma para tabelas e figuras: Tabela A.1; A fig. A.1, etc.

É essencial a página de título e informações

Título: Concisa e informativo. Os títulos são freqüentemente usados em sistemas de recuperação de informações. Evite abreviações e fórmulas sempre que possível.

• Os nomes dos autores e afiliações. Indique claramente o (s) nome (s) e nome (s) de família de cada autor e verifique se todos os nomes estão devidamente escritos. Apresentar os endereços de afiliação dos autores (onde o trabalho real foi feito) abaixo dos nomes. Indique todas as afiliações com uma letra de sobrescrito em minúscula imediatamente após o nome do autor e na frente do endereço apropriado. Forneça o endereço postal completo de cada afiliação, incluindo o nome do país e, se disponível, o endereço de e-mail de cada autor.

• Autor correspondente. Indicar claramente quem vai lidar com a correspondência em todas as fases de arbitragem e publicação, também pós-publicação. Certifique-se de que o endereço de e-mail é dado e que os detalhes de contato são mantidos atualizados pelo autor correspondente.

• Presente / endereço permanente. Se um autor se mudou desde que o trabalho descrito no artigo foi feito, ou estava visitando no momento, um "endereço atual" (ou "endereço permanente") pode ser indicado como uma nota de rodapé para o nome do autor. O endereço em que o autor realmente fez o trabalho deve ser mantido como o principal endereço de afiliação. Números arábicos sobrescritos são usados para tais notas de rodapé.

Resumo

Um resumo conciso e factual é necessário. O resumo deve indicar brevemente o objetivo da pesquisa, os principais resultados e principais conclusões. Um resumo é muitas vezes

apresentado separadamente do artigo, por isso deve ser capaz de ficar sozinho. Por esta razão, as referências devem ser evitadas, mas se essencial, em seguida, citar o autor (s) e ano (s). Além disso, devem ser evitadas abreviaturas não padronizadas ou incomuns, mas, se essenciais, devem ser definidas na sua primeira menção no próprio resumo.

Destaques

Destaques são obrigatórios para esta revista. Consistem em uma coleção curta dos pontos da bala que transportam as descobertas do artigo do núcleo e devem ser submetidas em um arquivo editable separado no sistema em linha da submissão. Utilize 'Destaques' no nome do arquivo e inclua de 3 a 5 pontos (máximo de 85 caracteres, incluindo espaços, por ponto). Você pode ver exemplos de destaques em nosso site informações.

Palavras-chave

Imediatamente após o resumo, fornecer um máximo de 6 palavras-chave, usando a ortografia americana e evitando termos gerais e plurais e diversos conceitos (evitar, por exemplo, 'e', 'de'). Ser poupador com abreviaturas: apenas abreviaturas firmemente estabelecidas no campo podem ser elegíveis. Essas palavras-chave serão usadas para fins de indexação.

Compostos químicos

Você pode enriquecer o seu artigo, fornecendo uma lista de compostos químicos estudados no artigo. A lista de compostos será usada para extrair informações relevantes do banco de dados do NCBI PubChem Compound e exibi-lo ao lado da versão on-line do artigo no ScienceDirect. Você pode incluir até 10 nomes de compostos químicos no artigo. Para cada composto, forneça as PubChem CIDdo registro mais relevante, como no exemplo a seguir: O ácido glutâmico (PubChem CID: 611). Por favor, posicione a lista de compostos imediatamente abaixo da seção "Palavras-chave". Recomenda-se vivamente a seguir a formatação do texto exato como no exemplo abaixo:

Compostos químicos estudados no artigo

etilenoglicol (PubChem CID: 174); Plitidepsina (PubChem CID: 44152164); Cloreto de benzalcónio (PubChem CID: 15865)

Mais informação

Abreviaturas

Definição de abreviações que não são padrão neste campo, em uma nota de rodapé para ser colocado na primeira página do artigo. Tais abreviaturas que são inevitáveis no resumo devem ser definidas na sua primeira menção lá, assim como na nota de rodapé. Assegurar a consistência das abreviaturas ao longo do artigo.

Agradecimentos

Agrupar reconhecimentos em uma seção separada no final do artigo, antes das referências e não fazer, portanto, incluí-los na página de título, como uma nota de rodapé para o título ou não. Listar aqui aqueles indivíduos que forneceram ajuda durante a pesquisa (por exemplo, fornecendo a ajuda de língua, escrevendo a ajuda ou a prova que lê o artigo, etc.).

Formatação de fontes de financiamento

Lista de fontes de financiamento devem estar de modo padrão, para facilitar a conformidade com os requisitos do financiador:

Financiamento: Este trabalho foi apoiado pelo National Institutes of Health [conceder números xxxx, yyyy]; A Fundação Bill & Melinda Gates, Seattle, WA [número de concessão zzzz]; E os Institutos de Paz dos Estados Unidos [número de concessão aaaa].

Não é necessário incluir descrições detalhadas sobre o programa ou tipo de subvenções e prêmios. Quando o financiamento é de um subsídio em bloco ou de outros recursos disponíveis para uma universidade, faculdade ou outra instituição de pesquisa, envie o nome do instituto ou organização que forneceu o financiamento.

Se nenhum financiamento foi fornecido para a pesquisa, inclua a seguinte frase:

Esta pesquisa não recebeu qualquer concessão específica de agências de financiamento nos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

Unidades

Siga as regras e convenções internacionalmente aceites: utilizar o Sistema Internacional de Unidades (SI). Se outras unidades forem mencionadas, por favor dê seu equivalente em SI.

Por favor envie equações matemáticas como texto editável e não como imagens. Apresentar fórmulas simples em linha com o texto normal sempre que possível e usar o solidus (/) em vez de uma linha horizontal para pequenos termos fracionários, por exemplo, X / Y. Em princípio, as variáveis devem ser apresentadas em itálico. As potências de e são muitas vezes mais convenientemente designadas por exp. Número consecutivamente quaisquer equações que têm de ser apresentada separadamente do texto (se referido explicitamente no texto).

Matematical e as definições técnicas

Use o número apropriado de algarismos significativos para expressar os seus dados - devem ser justificável e refletem o nível necessário de precisão do método. Um máximo normal deve ser 3 - eg 37.1, 2.53). Discussão matemática detalhada deve ser colocada em um apêndice. As equações e fórmulas devem ser dactilografadas. As equações devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos entre parênteses no lado direito da página. Símbolos especiais devem ser identificados na margem, eo significado de todos os símbolos deve ser explicado no texto onde eles ocorrem pela primeira vez. Se você usar vários símbolos, uma lista de definições (não necessariamente para publicação) ajudará o editor. Digite equações matemáticas exatamente como elas devem aparecer na impressão. O estilo do diário para símbolos de letras é o seguinte: itálico (indicado por sublinhado); Constantes, tipo romano; Matrizes e vetores, tipo negrito (indicado por sublinhado ondulado).

Notas de rodapé

As notas de rodapé devem ser usadas com moderação. Numere-os consecutivamente ao longo do artigo. Muitos processadores de texto podem criar notas de rodapé no texto, e esse recurso pode ser usado. Caso contrário, indique a posição das notas de rodapé no texto e liste as notas de rodapé separadamente no final do artigo. Não inclua notas de rodapé na lista Referência.

Pontos Gerais

• Certifique-se de usar letras uniforme e dimensionamento de sua arte original.
• Incorporar as fontes usadas se o aplicativo fornecer essa opção.
• Aponte para usar as seguintes fontes nas suas ilustrações: Arial, Courier, Times New Roman, Símbolo ou usar fontes parecidas.
• Numere as ilustrações de acordo com a sua sequência no texto.
• Use uma convenção de nomenclatura lógica para seus arquivos de arte.
• Fornecer legendas às ilustrações separadamente.
• Dimensione as ilustrações de acordo com as dimensões desejadas da versão publicada.
• Submeter cada ilustração como um arquivo separado.

Formatos

Se a sua arte eletrônica é criada em um aplicativo do Microsoft Office (Word, PowerPoint, Excel), então por favor fornecer "como está" no formato de documento nativo.

Independentemente do aplicativo utilizado, exceto o Microsoft Office, quando a arte eletrônica estiver concluída, por favor "Salvar como" ou converter as imagens para um dos formatos a seguir (observe os requisitos de resolução para desenhos de linha, meios-tons e combinações de linha):

EPS (ou PDF): desenhos vetoriais, incorporar todas as fontes utilizadas.

TIFF (ou JPEG): Fotografias em cores ou em tons de cinza (meio-tom), mantenha um mínimo de 300 dpi.

TIFF (ou JPEG): Desenhos de linha bitmapped (pixels pretos e brancos puros), mantenha um mínimo de 1000 dpi.
TIFF (ou JPEG): Combinações de linha / meio-tom de mapa de bits (cor ou escala de cinza), mantenha um mínimo de 500 dpi.
Por favor, não usar arquivos:
• Fornecimento que são otimizados para uso em tela (por exemplo, GIF, BMP, PICT, WPG); Estes tipicamente têm um baixo número de pixels e conjunto limitado de cores;
• Com resolução muito baixa;
• Gráficos que são desproporcionalmente grandes para o conteúdo.
Artwork cor
Por favor, certifique-se de que arquivos de arte estão em um formato aceitável (TIFF (ou JPEG), EPS (ou PDF) ou arquivos do MS Office) e com a resolução correta. Se, em conjunto com o seu artigo aceito, você enviar valores de cor utilizáveis, a Elsevier assegurará, sem custo adicional, que esses números aparecerão em cores on-line (por exemplo, ScienceDirect e outros sites), independentemente de essas ilustrações serem ou não reproduzidas em cores na versão impressa. Para reprodução de cores na impressão, você receberá informações sobre os custos de Elsevier após a recepção do seu artigo aceito. Indique a sua preferência por cor: apenas na versão impressa ou online. Mais informações sobre a preparação de arte electrónica
Legendas das figuras
Assegurar que cada ilustração tem uma legenda. Fornecer legendas separadamente, não anexado à figura. A legenda deve incluir um título breve (não na própria figura) e uma descrição da ilustração. Mantenha o texto nas ilustrações em si a um mínimo, mas explicar todos os símbolos e abreviaturas utilizadas.
Tabelas
Por favor envie tabelas como texto editável e não como imagens. As tabelas podem ser colocadas ao lado do texto relevante no artigo, ou em páginas separadas no final. Numere as tabelas consecutivamente de acordo com sua aparência no texto e coloque as notas da tabela abaixo do corpo da tabela. Ser poupador na utilização de tabelas e garantir que os dados apresentados neles não duplicar os resultados descritos em outro lugar no artigo. Por favor, evite usar regras verticais.
Referências e Citação no texto
Certifique-se que todas as referências citadas no texto também está presente na lista de referências (e vice-versa). Todas as referências citadas no resumo devem ser dadas na íntegra. Resultados não publicados e comunicações pessoais não são recomendados na lista de referência, mas podem ser mencionados no texto. Se estas referências estiverem incluídas na lista de referência, devem seguir o estilo de referência padrão da revista e incluir uma substituição da data de publicação por "Resultados não publicados" ou "Comunicação pessoal". Citação de uma referência como "na imprensa" implica que o item tenha sido aceito para publicação.
Referências da Web
No mínimo, a URL completa deve ser dada ea data em que a referência foi acessado pela última vez. Qualquer outra informação, se conhecida (DOI, nomes de autor, datas, referência a uma publicação de fonte, etc.), também deve ser dada. As referências da Web podem ser listadas separadamente (por exemplo, após a lista de referências) sob um cabeçalho diferente, se desejado, ou podem ser incluídas na lista de referências.
Referências de dados
Esta revista incentiva você a citar conjuntos de dados subjacentes ou relevantes em seu manuscrito citando-los em seu texto e incluindo uma referência de dados em sua lista de referências. As referências de dados devem incluir os seguintes elementos: nome (s) do autor, título do conjunto de dados, repositório de dados, versão (se disponível), ano e identificador

persistente global. Adicione [dataset] imediatamente antes da referência para que possamos identificá-la corretamente como uma referência de dados. O identificador [dataset] não aparecerá no artigo publicado.

Referências em uma edição especial

Certifique-se de que as palavras "esta questão 'são adicionados a quaisquer referências na lista (e quaisquer citações no texto) para outros artigos da mesma edição especial.

Software de gerenciamento de referência de revistas mais Elsevier têm o seu modelo de referência disponível em muitos dos produtos de software de gerenciamento de referência mais populares. Estes incluem todos os produtos que suportam estilos Citation estilo de linguagem, tais como Mendeley e Zotero, bem como EndNote . Usando os plug-ins de processador de texto desses produtos, os autores só precisam selecionar o modelo de revista apropriado ao preparar seu artigo, após o qual citações e bibliografias serão automaticamente formatadas no estilo do periódico. Se nenhum modelo ainda estiver disponível para esta revista, siga o formato das referências e citações de exemplo, conforme mostrado neste Guia.

Os usuários do Mendeley Desktop podem instalar facilmente o estilo de referência para esta revista, clicando no seguinte link: http://open.mendeley.com/use-citation-style/food-control

Ao preparar o seu manuscrito, então você vai ser capaz de selecionar Este estilo usando os plug-ins Mendeley para Microsoft Word ou LibreOffice.

Referência de estilo

As citações no texto devem seguir o estilo de referência utilizado pela American Psychological Association. Está previsto o Manual de publicação da American Psychological Association, sexta edição, ISBN 978-1-4338-0561-5, cujas cópias podem ser encomendadas on-line ou APA Ordem Dept., POB 2710, Hyattsville, MD 20784, EUA ou APA, 3 Henrietta Street, Londres, WC3E 8LU, Reino Unido.

Lista: as referências devem ser organizadas em ordem alfabética primeiro e depois mais ordenados cronologicamente, se necessário. Mais de uma referência do (s) mesmo (s) autor (es) no mesmo ano deve ser identificada pelas letras «a», «b», «c», etc., colocadas após o ano de publicação.

Exemplos: referência a uma publicação da revista:

Van der Geer, J., Hanraads, JAJ, & Lupton, RA (2010). A arte de escrever um artigo científico. Journal of Communications científicos, 163, 51-59.

A referência a um livro:

Strunk, W., Jr., & White, EB (2000). Os elementos do estilo. (4a ed.). Nova Iorque: Longman, (Capítulo 4).

Referência a um capítulo em um livro editado:

Mettam, GR, e Adams, LB (2009). Como preparar uma versão eletrônica do seu artigo. No BS Jones, & RZ Smith (Eds.), Introdução à era eletrônica (pp. 281-304). New York: E-Publishing Inc.

Referência a um site:

Cancer Research UK. Relatórios de estatísticas de câncer para o Reino Unido. (2003). Http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/ Acessado em 13.03.03.

A referência a um conjunto de dados:

[conjunto de dados] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T. (2015). Os dados de mortalidade para a doença murchidão do carvalho japonês e composições florestais circundantes. Mendeley Data, v1. Http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1.

Journal Fonte abreviaturas

Nomes das revistas devem ser abreviados de acordo com a Lista de título do Word abreviações.