



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

Luanne Gianjoppe Luciano

**Qualidade microbiológica de peixes e frutos do mar
em Botucatu, SP.**

2009

Luanne Gianjoppe Luciano

**Qualidade microbiológica de peixes e frutos do mar
em Botucatu, SP.**

Monografia apresentada ao
Departamento de
Microbiologia/Imunologia do Instituto
de Biociências – UNESP, Campus de
Botucatu, para a obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vera Lúcia Mores Rall

BOTUCATU / SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Luciano, Luanne Gianjoppe.

Qualidade microbiológica de peixes e frutos do mar em Botucatu, SP /
Luanne Gianjoppe Luciano. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade
Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientador: Vera Lúcia Mores Rall

1. Alimentos de origem animal - Contaminação 2. Peixes 3. Frutos do
mar

Palavras-chave: Frutos do mar: *Salmonella*; *Staphylococcus coagulase*
positiva

*Dedico esse trabalho aos meus pais,
Luiz e Lucinda.*

Agradecimento

Aos meus pais, pela minha educação, pelo apoio, dedicação, amor incondicional, e por serem meus eternos exemplos em todos os sentidos da vida.

À minha família pelo carinho e incentivo durante essa caminhada, sem os quais seria tão difícil seguir com confiança no caminho certo.

À minha orientadora Prof^a. Vera, pela oportunidade de descobrir uma paixão pela Microbiologia, pela confiança, disponibilidade, dedicação, incentivo e amizade.

Aos meus colegas de laboratório: Sara, Ivana (Xev's), Débora (Distraída) e Elisângela pela convivência harmoniosa.

Ao Carlos e à Natália, pela paciência, disponibilidade, aprendizado e grande ajuda no desenvolvimento deste projeto.

Ao Pedro e Tino, por serem tão prestativos e por tornarem as manhãs na sala de meio de cultura mais divertidas.

À todos do Departamento de Microbiologia. Obrigado pela convivência, momentos de descontração, aprendizado e apoio.

À Lígia (Colorama), Marina (Purga), M^a Fernanda (Toxó), Nabila (Matuska), Regiane (Maldição), pela amizade, convivência, carinho e apoio em todos os momentos.

*“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas,
que já têm a forma do nosso corpo,
e esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos
mesmos lugares.*

*É o tempo da travessia.
E se não ousarmos fazê-la,
teremos ficado, para sempre,
à margem de nós mesmos.”*

Fernando Pessoa

Este trabalho de conclusão de curso é apresentado na forma de um artigo científico, redigido segundo as normas da revista “Higiene Alimentar”.

Resumo

Nas últimas duas décadas, houve um aumento na produção e no consumo mundial de peixes. É estimado que a produção mundial de pescado seja em torno de 100 milhões de toneladas/ano, sendo 70 delas destinada exclusivamente à alimentação humana. O pescado e seus derivados têm uma grande importância na dieta de todo o mundo, contribuindo com ¼ da oferta mundial de proteína de origem animal. As características nutricionais dos frutos do mar e peixes fazem deles um alimento benéfico à saúde, pois são ricos em proteínas, vitaminas, micronutrientes e gorduras insaturadas. Porém um dos temas em crescente discussão, em saúde pública, refere-se à segurança alimentar. Só nos EUA, acontecem 76 milhões de casos de doenças de origem alimentar, com 325 mil hospitalizados e 5 mil mortes todos os anos. Pela RDC nº12, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2001) definiu que pescados, ovas de peixes, crustáceos e moluscos cefalópodes “in natura” resfriados ou congelados, não consumidos crus devem apresentar o seguinte padrão microbiológico: ausência de *Salmonella* em 25g e tolerância de até 10^3 NMP de *Estafilococos* coagulase positiva/g de alimento. Baseado nisto, este trabalho teve como objetivo verificar se peixes e frutos do mar comercializados frescos ou congelados, em supermercados e peixarias do município de Botucatu atendiam aos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, através da RDC nº12. Foram analisadas 100 amostras, sendo 65 congeladas (65%) e 35 frescas (35%). As amostras incluíam peixes, como sardinha, pescada do sul, tilápia, bacalhau, peixe-serra, abrotea, namorado, merluza, abadejo, Saint Peter, manjuba, corimbata, pintado, cavalinha, pescada branca, cação, filhote, salmão, cascudo, inteiros, em filé, ou em postas, além de camarões, mexilhões, mariscos, lula (em tubo e anéis), polvo (inteiro e tentáculos) vieira e vongoli. Totalizando entre as amostras congeladas, 31 peixes e 34 frutos do mar e entre as resfriadas, 28 peixes e 7 frutos do mar. Os métodos utilizados para análise estão de acordo com o APHA (2001). As amostras foram adquiridas em 4 estabelecimentos (3 supermercados e uma peixaria). Dentre as 100 amostras analisadas, todas foram negativas para presença de *Estafilococos* coagulase positiva e 2 foram positivas para *Salmonella* (2%). A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que, apesar de aparecer em uma pequena porcentagem, a presença de *Salmonella* é um fator de risco para a saúde dos consumidores. Deste modo, deve-se ter maior cuidado na conservação dos pescados e dos frutos do mar, pois embora os alimentos pareçam saudáveis visivelmente, podem estar contaminados por patógenos. Esses alimentos não devem ser consumidos crus. Apesar de o congelamento ser uma boa maneira de conservação, este processo não elimina totalmente os patógenos do alimento.

Palavras Chave: peixes, frutos do mar, *Salmonella*, *Staphylococcus* coagulase positiva.

Abstract

In the last two decades, there was an increase in the production and consumption of fish in the whole world. The world production of fish is around 100 million tons/year and 70% of them is destined exclusively to human feeding. Fish and derived products have a great importance in the human diet, contributing with 1/4 of the offer of protein of animal origin. Seafood and fish are healthy, because they are rich in proteins, vitamins, micronutrients and unsaturated fats. However, one of the most important themes, in public health, refers to safe food. Only in the USA, 76 million cases of foodborne diseases occur every year, with 325 thousand hospitalized and 5 thousand deaths. According to the microbiological parameters, the Brazilian Food Sanitation Standard (Decree No. 12, 2001) defined that fish, roes of fish, crustaceans and mollusks "in natura" cooled or frozen, not consumed raw should present up to 10^3 MPN of coagulase positive *Staphylococcus* in the absence of *Salmonella* in 25g. Based on this, this work verified the microbiological quality of fish and seafood retailed in supermarkets and fish store in Botucatu city. A hundred samples were analyzed, being 65 frozen (65%) and 35 cooled (35%). The samples included various kinds of fish and seafood. Among the frozen samples, 31 were fish and 34 seafood. About the cooled ones, 28 were fish and 7 seafood. The methods used for analysis are in agreement with APHA (2001). The samples were acquired in 4 establishments (3 supermarkets and a fish store). In a total of 100 samples, all were negative to coagulase positive *Staphylococcus* and 2 were positive for *Salmonella* (2%). According to the results, we conclude that the presence of *Salmonella* is a risk factor for the consumers' health and these foods should not be consumed raw. In spite of the freezing to be a good conservation way, this process doesn't totally eliminate the pathogens of the food.

Key words: fish, seafood, *Salmonella*, *Staphylococcus* coagulase positive.

Sumário

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Os nutrientes do pescado.....	11
1.2. Segurança Alimentar.....	11
1.3. Microbiota e Contaminação do Pescado.....	12
1.4. Legislação Brasileira.....	13
1.4.1. <i>Salmonella</i> sp.....	14
1.4.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1. Coleta das Amostras para Análise.....	17
3.2. Análises Microbiológicas.....	17
3.2.1. Preparo das Amostras e suas Diluições.....	17
3.2.2. Identificação de Estafilococos Coagulase Positiva (ECP).....	17
3.2.3. Detecção da presença de <i>Salmonella</i>	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5. CONCLUSÃO.....	25
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

1. INTRODUÇÃO

Nas última duas décadas, houve um aumento na produção e no consumo mundial de peixe (Feldhusen, 2000). É estimado que a produção mundial de pescado esteja em torno de 100 milhões de toneladas/ano, sendo 70 delas destinada exclusivamente à alimentação humana (Huss et al., 2000). Em 2003, a produção mundial de pescado foi de 132 milhões de toneladas e a aquicultura contribuiu com 48,4 milhões de toneladas, de acordo com a Food and Agriculture, FAO (2003). Segundo a Secretaria de Aquicultura e Pesca, SEAP (2006), a produção vem crescendo rapidamente no mundo, contribuindo de forma cada vez mais efetiva com o suprimento mundial de pescado. Hoje, 43% do pescado consumido no planeta já vêm do cultivo de peixes, camarões, moluscos ou outros organismos aquáticos (no Brasil, o setor é responsável por 27% da produção pesqueira).

A média mundial anual do consumo de peixe é de 15 kg/pessoa, enquanto que a recomendada pela World Health Organization (WHO) é de 12 kg/habitante. Seguindo uma tendência mundial, o consumo médio brasileiro de peixe, que era de 6,8 kg em 2003 atingiu 8 kg por habitante em 2005 (SEAP, 2006). Na figura 1, pode-se observar a distribuição, mundial do consumo de peixe.

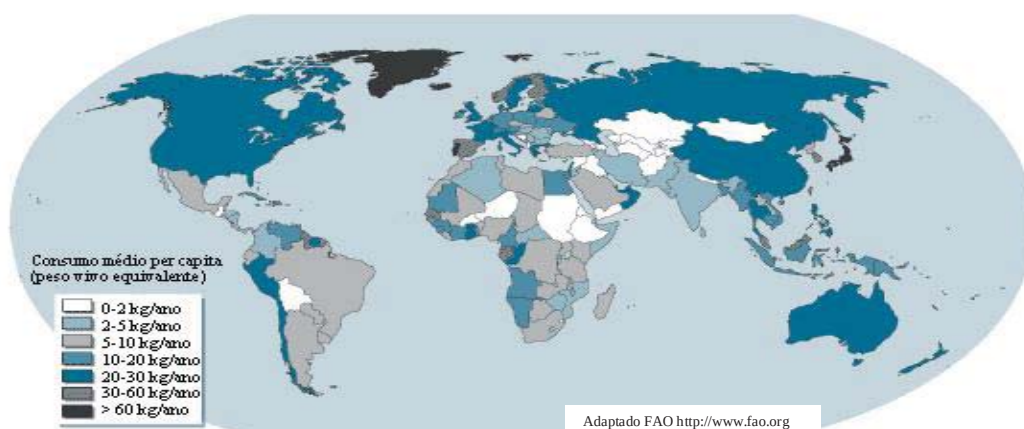


Figura 1: Consumo *per capita* de peixe e seus produtos no mundo.

1.1. Os nutrientes do pescado

O pescado e seus derivados têm uma grande importância na dieta de todo o mundo (Feldhusen, 2000), contribuindo com ¼ da oferta mundial de proteína de origem animal (Kent, 1997; Josupeit, 2004). Na Europa e na Ásia, o pescado é a principal fonte de proteína animal (Huss et al., 2000).

As características nutricionais dos frutos do mar e peixes fazem deles um alimento benéfico à saúde, pois é rico em proteínas, vitaminas, micronutrientes e gorduras insaturadas (Huss et al., 2000).

1.2. Segurança Alimentar

Um dos temas sempre em discussão, em saúde pública, refere-se à segurança alimentar. Segundo a WHO (2007), em todo o mundo, buscam-se melhorias na qualidade dos alimentos e prevenção de doenças transmitidas por alimentos (DTAs). No entanto, o número de problemas relacionados a alimentos ainda permanece significativo, com elevados índices de doenças de origem alimentar (DOAs) e que vem aumentando nas últimas décadas (Schlundt, 2002).

Em 1996, a World Food Summit (Kurien, 2005), definiu que “Existe segurança dos alimentos quando todas as pessoas, em todos os momentos, têm acesso físico e econômico à alimentação suficiente, sadia e nutritiva e que atenda as necessidades nutricionais e preferências alimentares para uma vida ativa e saudável”.

Segundo a WHO (2007), as DOAs são àquelas causadas por agentes patogênicos ou por toxinas presentes no alimento. Qualquer pessoa corre o risco de adquirir uma DTA, sendo os indivíduos mal nutridos, imunodeficientes, crianças e idosos os mais suscetíveis (Schlundt, 2002).

A transmissão de DOAs ocorre através da entrada do patógeno e/ou toxinas no trato gastrointestinal, onde, geralmente, provocam os primeiros sintomas, como náusea, vômito, dor abdominal e diarreias. Às vezes, a sintomatologia pode ocorrer tardiamente, após um longo período de exposição e ser associada à etiologia multifatorial, não perfazendo um quadro de DTAs clássico (Mead et al., 1999; CDC, 2005).

A prevenção de DTAs é muito complexa, pois são inúmeros os patógenos que podem se inserir na cadeia alimentar. Embora os alimentos pareçam saudáveis visivelmente, a carne, ovos, frutos do mar, peixes, leite, podem estar contaminados por patógenos como a *Salmonella*. Frutas, legumes e verduras podem ser contaminados já no campo ou após a colheita por bactérias, como a *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae* e *Staphylococcus aureus*. Também pode ocorrer a contaminação dos alimentos por pessoas infectadas durante a manipulação e a recontaminação após tratamento térmico (CDC, 2003).

Inúmeros fatores colaboram com o aumento global de DTAs, entre eles o fluxo internacional de pessoas e mudanças de hábito alimentar. O mundo globalizado é apontado como um importante fator, pois os patógenos presente nos alimentos podem atravessar fronteiras e causar doenças emergentes (Kruse, 1997).

As intoxicações alimentares, em sua maioria, não são notificadas, pois poucos países possuem um sistema de notificação de DTAs ou não notificam aos órgãos de inspeção ou agência de saúde porque seus sintomas são geralmente brandos e o doente não busca auxílio médico (Forsythe, 2002). Segundo os dados do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), foram notificados até agosto de 2008, 35 surtos de origem alimentar e hídrica, envolvendo 1.433 pessoas, no estado de São Paulo. Só na capital, foram notificados 7 surtos de origem alimentar e hídrica, todos no primeiro semestre de 2008. O principal sintoma foi à diarreia, sendo apenas um caso de intoxicação. Os alimentos contaminados eram de diferentes origens, ocorrendo um caso com carne de siri, onde o patógeno responsável pelos sintomas não foi identificado. Algumas sociedades, devidos aos seus hábitos culturais, associam a diarreia, um dos principais sintomas da infecção alimentar, como sendo indigestão, excesso de condimentos e superstição (Motarjemi, 1997). Além disso, as DTAs não são bem documentadas na literatura científica, pois a publicação dessa precisa satisfazer pré-requisitos como o envolvimento de grande número de pessoas, ou patógeno incomum ou emergente, um novo ou incomum alimento (Reij, 2004).

A incidência mundial de surtos de origem alimentar é de difícil estimativa, mas cerca 1,8 milhões de pessoas morreram de diarreia em 2005. A maioria desses casos foi atribuída à contaminação de alimentos e água. Nos países industrializados, as doenças de origem alimentar afetam acima de 30% da população. Nos EUA, 76 milhões de casos de DOAs, 325 mil hospitalizados e 5 mil mortes são estimados por ano. (WHO, 2007).

1.3. Microbiota e Contaminação do pescado

O sistema HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point – Análise de Perigos e Ponto Críticos de Controle - APPCC) tem sido aplicado com muito sucesso pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) desde 1973 para controlar os perigos microbiológicos. O sistema parte do princípio que em vários pontos podem existir perigos microbiológicos, com medidas adequadas para controlá-los. A previsão dos perigos e a identificação dos pontos de controle são elementos chave no sistema HACCP. Este sistema propõe uma abordagem racional e lógica para controlar os perigos dos alimentos (Huss, 1997a).

A primeira etapa, onde pode ocorrer contaminação é no habitat original de cada alimento. O lançamento de esgotos nas águas de reservatórios, lagos, lagoas, rios, mar e

tanques contaminam o pescado oferecendo risco para o consumidor final, o homem. A maneira como são capturados também pode levar a contaminação. Durante a captura principalmente com rede de arrasto, os peixes são arrastados pelo fundo do mar, revolvendo sedimentos, que podem carrear uma carga microbiana de 10 a 100 vezes maior quando comparada à captura por anzol (Huss et al., 2000; Schlundt, 2002; Reiji, 2004; Hamada-Sato et al., 2005; Basti et al., 2006).

Outra etapa importante é o manejo do pescado, desde a captura, ainda nos barcos dos pesqueiros, até o seu destino final, passando por fases de beneficiamento, transporte e comercialização. Durante o beneficiamento, o peixe pode ser eviscerado, preparado em files ou postas, onde pode ocorrer a contaminação se não houver boas práticas de processamento, higienização e sanitização adequadas (Huss et al., 2000). A água em contato com os alimentos de origem animal, inclusive a usada para higienização de equipamentos e indústrias deve ter o mesmo padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano. As normas legais exigem que a água usada pelas indústrias não apresentem nenhum coliforme termotolerante (Brasil, 2003).

A recontaminação (contaminação após o tratamento térmico) é outro fator importante em surtos de DTAs. O uso de utensílios, de equipamentos não higienizados, a falta de higiene dos manipuladores e de sanitização do ambiente, onde o alimento será manipulado e a presença de vetores, como insetos e roedores são transmissores de microrganismos (Reij, 2004).

Ao analisar peixes e frutos do mar após a pesca, esses podem revelar as condições ambientais, a qualidade microbiológica da água e do próprio pescado, assim como: temperatura da água, teor de sal, alimentação do peixe, etc. Estes indicadores são particulares de cada região, como áreas costeiras, rios, lagos, tanques e estuários (Feldhusen, 2000). O clima de cada região é de considerável importância para esses indicadores.

Segundo Feldhusen (2000), as bactérias patogênicas podem ser encontradas na pele, guelras e no intestino dos peixes, com *Vibrio cholerae*, *V. parahemolyticus*, *V. vulnificus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Aeromonas hydrophila*; *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella sp*, *Campylobacter sp*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens*.

1.4. Legislação Brasileira

Visando a saúde da população, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº12 (2001) definiu que pescado, ovas de peixes, crustáceos e moluscos cefalópodes “in natura”, resfriados ou congelados, não consumidos cru podem apresentar até 10^3 NMP/g de estafilococos coagulase positiva/g, na ausência de *Salmonella* em 25 g.

1.4.1. *Salmonella* sp

A *Salmonella* é uma das mais importantes causas de DOAs no mundo (Theys, 2008). É um gênero que compreende bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, pertencentes à família Enterobacteriaceae, móvel, exceto por *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, não formadora de esporos. Esses microrganismos multiplicam-se entre 5°C e 47°C, com um crescimento ótimo entre 35-38°C, mas estes valores variam de acordo com o sorotipo (FDA, 2006).

As espécies de salmonelas são distribuídas amplamente pelo ambiente, sendo encontradas, principalmente, no trato gastrointestinal de aves, insetos, mamíferos e répteis. Apesar do meio aquático não ser um reservatório natural, ela pode estar presente devido à contaminação fecal, podendo ser detectada em peixes e produtos derivados (FDA, 2006). As aves têm se revelado um ótimo vetor, disseminando as salmonelas pelas fezes e a presença da bactéria no canal ovopositor das galinhas é capaz de contaminar as gemas dos ovos (FDA, 2006).

As doenças causadas pelas salmonelas são a febre tifóide, febres entéricas, septicemia e enterocolites (salmoneloses).

A febre tifóide é causada pela *S. Typhi* e o homem é o único reservatório desta bactéria, sendo esta a principal fonte de contaminação. Altamente infectante, possui uma taxa de mortalidade de cerca de 10%. A transmissão é via oral-fecal, através de água e alimentos contaminados. Os bacilos são, periodicamente, eliminados nas fezes ou urina do doente até o terceiro mês do início do quadro clínico em 10% dos doentes e até 1 ano e, provavelmente, por toda a vida, em 1 a 5% dos portadores crônicos. Os sintomas são febre alta, diarreia, vômitos e se a bactéria atingir o sangue pode levar a um quadro de septicemia (Franco, 2003; Eduardo, 2006).

S. Paratyphi causa a febre entérica, que é semelhante à febre tifóide, porém os sintomas são mais brandos. As salmoneloses são causadas pelas demais salmonelas e a sintomatologia envolve diarreia, vômito, febre e dores abdominais. Uma das espécies isolada frequentemente de ovos, é a *S. Enteritidis* (Franco, 2003; FDA, 2006).

Em 2006, nos Estados Unidos, 6.655 dos 17.252 casos confirmados de DOA foram causados por *Salmonella*, sendo *Salmonella Typhi*, responsável por 1157 (Theys, 2008). Todo ano, aproximadamente, 40.000 casos de salmoneloses são relatados nesse país. Como muitos casos não são diagnosticados e/ou relatados, estima-se que o número real de infecções seja três vezes maior. Cerca de 400 pessoas morrem todos os anos devido a essa doença e crianças, idosos e imunodeficientes são os mais susceptíveis (CDC, 2008).

1.4.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, pertencentes à família Staphylococcaceae. Apresentam crescimento ótimo a 37°C, podendo variar numa faixa de temperatura entre 7 a 46°C. Os estafilococos podem ser encontrados na água, ar, poeira, leite e esgotos. O homem e os animais são reservatórios naturais desses microrganismos e o principal habitat é a mucosa do nariz e a pele. Os portadores podem atingir até 60% dos indivíduos saudáveis, havendo uma média de 25 a 30% da população que é portadora de estirpes produtoras de enterotoxinas.

Segundo a FDA (2006), os estafilococos são responsáveis por, aproximadamente, 45% das toxinfecções do mundo, sendo que uma dose menor que 1µg de enterotoxina é suficiente para produzir os sintomas da intoxicação por *Staphylococcus aureus*. Esta dose de enterotoxina é alcançada quando a população atinge mais que 10⁵ UFC/g de alimento.

Algumas cepas são capazes de produzir enterotoxinas estafilocócicas, que são termoestáveis e responsáveis pelas intoxicações alimentares no homem. A transmissão ocorre quando há ingestão dessas enterotoxinas, produzidas no alimento (Forsythe, 2002; Franco, 2003; FDA, 2006).

A intoxicação alimentar estafilocócica, geralmente possui um início abrupto e violento, os sintomas aparecem em média de 2 – 4 horas após a ingestão do alimento, ocorrendo náuseas, vômitos, cólicas, prostração, pressão baixa e temperatura subnormal. Alterações na frequência cardíaca podem também ser observadas. A recuperação ocorre em até dois dias, porém, alguns casos podem se prolongar e exigir hospitalização. O diagnóstico é característico, especialmente quando há um grupo de casos, com predominância de sintomas gastrintestinais superiores e com intervalo curto entre o início dos sintomas e ingestão de um alimento comum. A real frequência da intoxicação estafilocócica é desconhecida, seja por erro diagnóstico, por ser similar com outras intoxicações, por coleta inadequada de amostras para testes laboratoriais, exames laboratoriais impróprios ou investigações epidemiológicas inadequadas dos surtos. No estado de São Paulo foram notificados somente 25 surtos por *S. aureus*, envolvendo quase 200 pessoas, nos anos de 2001 e 2002 (CVE, 2003).

Como o *S. aureus* é um indicador das condições higiênicas, sua presença indica má condição higiênica durante o processamento e/ou armazenamento dos alimentos. A contaminação do produto pode ser resultado da combinação de manipulação indevida, armazenamento inadequado e contaminação cruzada. (Simon, 2007).

2. OBJETIVOS

Baseado na revisão bibliográfica realizada, este trabalho teve por objetivo verificar se peixes e frutos do mar comercializados frescos ou congelados, em supermercados e peixarias no município de Botucatu estavam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, através da RDC nº12, com a realização da pesquisa da presença de *Salmonella* e a enumeração de Estafilococos coagulase positiva (ECP).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta das Amostras para Análise

Foram analisadas 100 amostras de peixes e frutos do mar, coletadas em supermercados e peixarias, no município de Botucatu, SP. As amostras foram mantidas dentro das próprias embalagens e armazenadas dentro de bolsas térmicas até serem transportadas para o laboratório.

No caso de amostras industrializadas, foram anotados o prazo de validade, marca e lote do produto.

3.2. Análises Microbiológicas

3.2.1. Preparo das amostras e suas diluições

Para a análise, 25 gramas de amostra foram pesados e homogeneizados em 225 ml de água tamponada esterilizada, em sacos plásticos apropriados, que foram levados ao Stomacher Lab Blender 400 por 30 segundos. A partir desta diluição inicial de 10^{-1} , foram preparadas várias diluições decimais, utilizando-se o mesmo diluente.

3.2.2. Identificação de Estafilococos Coagulase Positiva (ECP) (LANCETTE & BENNETT, 2001)

Para a enumeração dos estafilococos, foi utilizado o método da semeadura em superfície, por meio do qual 0,1ml das diversas diluições da amostra foram depositados em placas de Petri com Agar Baird-Parker (BP), suplementado com telurito de potássio e solução de gema de ovo, espalhando-se o inóculo com o auxílio de um bastão de vidro em “L”. Após a incubação a 35°C, por até 48 horas, as colônias suspeitas de estafilococos apresentavam cor negra, com halo e até 5 foram repicadas para tubos com Agar Trypticase Soja (TSA) inclinado, incubados por 24 horas, a 35°C e a seguir foram submetidos aos testes bioquímicos de catalase e coagulase em tubo.

Para o teste da produção de catalase, uma porção do crescimento de 24 horas do TSA foi transferida, com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, para uma lâmina de vidro. Em seguida, foi adicionada uma gota de água oxigenada 30%. Como controle positivo, usou-se uma cepa de *S. aureus* e como controle negativo, uma de *Streptococcus* sp. O teste positivo foi revelado pela liberação de bolhas (Mac FADDIN, 1976). A seguir, foi realizado o teste da coagulase em tubo (Mac FADDIN, 1976), utilizando-se 0,25 ml de plasma de coelho, adicionado um volume de 0,5 ml de uma cultura da cepa teste em caldo de infusão de cérebro

e coração (BHI), crescida 24 horas a 35°C. O tubo foi incubado a 35°C e as leituras realizadas após 30 minutos, 6 horas e 24 horas. O teste foi considerado positivo quando ocorreu a coagulação da mistura.

3.2.3 Detecção da presença de *Salmonella* (ANDREWS et al., 2001)

Para a detecção da presença de *Salmonella*, 25 gramas de amostra foram homogeneizados em 225 mL de água peptonada a 1 %, em "Stomacher" durante 30 segundos. Após esse período, o homogeneizado foi transferido a frascos esterilizados e incubado a 35°C por 24 horas. Em seguida, foi transferido 1 mL do homogeneizado para um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo tetrationato com iodeto de potássio, incubado a 35°C por 24 horas. Outra alíquota, de 0,1 mL, foi transferida para um tubo com 10 mL de caldo Rapaport, incubado a 42°C por 24 horas. Após este período, uma alçada de cada tubo foi semeada em placas de Petri contendo ágar XLD (xilose-lisina-desoxicolato) e ágar SS (*Salmonella-Shigella*), sendo as placas incubadas invertidas a 35°C por 24 horas. A seguir, as colônias características de *Salmonella* foram repicadas para tubos de ensaio contendo TSA e incubadas a 35°C por 24 horas (cepas estoque). A partir dessas, foram realizados os testes bioquímicos com o ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI), ágar Fenilalanina e decarboxilação das lisina, para confirmação das cepas características. As cepas que apresentaram leitura característica de *Salmonella* nesses testes foram submetidas ao kit API 20 E (Biomérieux, França), com 20 testes bioquímicos para enterobactérias.

Após a leitura positiva dos testes bioquímicos, as cepas suspeitas foram testadas sorologicamente, com soro somático (Ag O) e flagelar (Ag H), para confirmação de *Salmonella* sp.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 100 amostras de peixes e frutos do mar, sendo 65 congeladas (65%) e 35 frescas (35%). Entre as amostras haviam peixes, como sardinha, pescada do sul, tilápia, bacalhau, peixe-serra, abrotea, namorado, merluza, abadejo, Saint Peter, manjuba, corimbata, pintado, cavalinha, pescada branca, cação, filhote, salmão, cascudo, podendo ser inteiros, em filé ou em postas, além de camarões, mexilhões, mariscos, lula (em tubo e anéis), polvo (inteiro e tentáculos), vieira e vongoli.

Entre as amostras resfriadas, 28 eram peixes e 7, frutos do mar e a Tabela 1 apresenta os resultados das análises microbiológicas, segundo os parâmetros da RDC N°12. Em relação às amostras congeladas, 31 eram peixes e 34, frutos do mar. Os resultados das análises microbiológicas estão expressos na Tabela 2.

Tabela 1. Resultado das análises microbiológicas de peixes e frutos do mar resfriados, comercializados na cidade de Botucatu/SP, 2009.

Amostra	Presença de <i>Salmonella</i>	ECP (UFC/g)
Camarão Cinza Grande	Ausência	<100
Filé Sardinha Limpo	Ausência	<100
Filé Pescado do Sul	Ausência	<100
Manjuba Inteira	Ausência	<100
Camarão Cinza Grande	Ausência	<100
Camarão Cinza Inteiro	Ausência	<100
Camarão Cinza Grande	Ausência	<100
Sardinha Fresca	Ausência	<100
Cavalinha Inteira	Ausência	<100
Sardinha Fresca	Ausência	<100
Pescada Branca	Ausência	<100
Filé Pescada Branca	Ausência	<100
Filé Salmão	Ausência	<100
Filé de Cação	Ausência	<100
Filé Pescada sem pele	Ausência	<100
Sardinha Limpa	Ausência	<100
Pescada Branca limpa	Ausência	<100
Pescada Branca Inteira	Ausência	<100
Cavalinha Inteira	Ausência	<100
Sardinha Inteira	Ausência	<100
Camarão Grande	Ausência	<100
Camarão Cinza Inteiro	Ausência	<100
Filé Saint Peter	Ausência	<100
Filé Abrotea Fresca	Ausência	<100
Namorado Fresco	Ausência	<100
Filé Salmão	Ausência	<100
Camarão Branco	Ausência	<100
Manjuba Inteira	Ausência	<100
Pescada branca	Ausência	<100
Filé Cação	Ausência	<100
Filé Salmão	Ausência	<100
Pescada Branca Inteira	Ausência	<100
Peixe Serra Fresco	Ausência	<100
Filé Sardinha	PRESENÇA	<100
Posta de Cação	Ausência	<100

UFC/g: Unidades Formadoras de Colônias
ECP: Estafilococos coagulase positiva

Tabela 2. Resultado das análises microbiológicas de peixes e frutos do mar congelados, comercializados na cidade de Botucatu/SP. 2009. continua

Amostra	Presença de <i>Salmonella</i>	ECP(UFC/g)
Mexilhão Limpo	Ausência	<100
Camarão IQFC Limpo	Ausência	<100
Filé de Tilápia	Ausência	<100
Peixe Manjuba	Ausência	<100
Sardinha	Ausência	<100
Camarão	Ausência	<100
Peixe Corimbata	Ausência	<100
Camarão Descascado	Ausência	<100
Postas Pintado	Ausência	<100
Mexilhão Descascado	Ausência	<100
Marisco Meia Concha	Ausência	<100
Lula Calamar	Ausência	<100
Anel Lula	Ausência	<100
Camarão 7BL	Ausência	<100
Camarão Vermelho	Ausência	<100
Vieira com Ovos	Ausência	<100
Lula Tubo	Ausência	<100
Postas Cação	Ausência	<100
Postas Peixe Filhote	Ausência	<100
Anel Lula	Ausência	<100
Camarão Descascado	Ausência	<100
Camarão Médio Limpo	Ausência	<100
Sardinha Eviscerada	Ausência	<100
Manjuba	Ausência	<100
Camarão Vermelho	Ausência	<100
Filé de Peixe Dourada	Ausência	<100
Camarão Vermelho	Ausência	<100
Postas Cascudo	Ausência	<100
Vongoli Limpo	PRESENÇA	<100
Lula Tubo	Ausência	<100
Mexilhão ½ Casca	Ausência	<100
Lula em Anéis	Ausência	<100
Filé Pescada sem pele	Ausência	<100
Filé Tilápia	Ausência	<100
Filé Merluza	Ausência	<100
Postas Cação	Ausência	<100
Filé Merluza Congelado	Ausência	<100

Tabela 2. Resultado das análises microbiológicas de peixes e frutos do mar congelados, comercializados na cidade de Botucatu/SP. 2009. continuação

Amostra	Presença de <i>Salmonella</i>	ECP(UFC/g)
Filé Merluza Alaska	Ausência	<100
Filé Bacalhau Ling	Ausência	<100
Tilápia Inteira	Ausência	<100
Filé Merluza Congelada	Ausência	<100
Filé Tilápia	Ausência	<100
Camarão Congelado	Ausência	<100
Sardinha Inteira	Ausência	<100
Filé Tilápia Congelada	Ausência	<100
Camarão Descascado	Ausência	<100
Camarão Congelado	Ausência	<100
Filé Pescada Congelada	Ausência	<100
Mexilhão Descascado	Ausência	<100
Anéis de Lula	Ausência	<100
Polvo Inteiro Congelado	Ausência	<100
Postas Pintado	Ausência	<100
Postas Cação	Ausência	<100
Filé Pescada	Ausência	<100
Lula Congelada	Ausência	<100
Lula em Anéis	Ausência	<100
Carne Vieira Média	Ausência	<100
Filé Abadejo Congelado	Ausência	<100
Filé Tilápia S. Peter	Ausência	<100
Mexilhão Limpo	Ausência	<100
Filé Merluza Congelado	Ausência	<100
Vongoli Limpo	Ausência	<100
Camarão 7 Barbas	Ausência	<100
Tentáculos Polvo	Ausência	<100
Filé Merluza Congelado	Ausência	<100

UFC/g: Unidades Formadoras de Colônias
ECP: Estafilococos coagulase positiva

Como pode ser observado pelas Tabelas 1 e 2, em nenhuma amostra foi detectada a presença de *Estafilococos* Coagulase positiva (ECP) e duas amostras (2%) foram positivas para *Salmonella*.

De acordo com a RDC N°12 (2001), para esse tipo de alimento é permitido até 10^3 NMP de ECP/g, na ausência de *Salmonella* em 25 g. Assim, por estes parâmetros, somente 2% das amostras encontravam-se impróprias ao consumo. Esse microrganismo foi isolado de filé de sardinha fresco e de vongoli já limpo congelado. Esta porcentagem, apesar de baixa, é preocupante pois *Salmonella* é um patógeno que causa doenças graves, além do fato de vários peixes e frutos do mar serem consumidos crus. Também deve ser observado que o filé de sardinha fresco estava acondicionado diretamente no gelo, sem embalagem podendo causar contaminação cruzada com outros produtos ou até mesmo ser consequência dessa contaminação. Segundo Bean (1997), aproximadamente 7% dos surtos de salmonelose foram ligados à pescados e frutos do mar. De acordo com D'auost (1994), a incidência de *Salmonella* é variável entre os diferentes países, sendo menor em países desenvolvidos, como por exemplo o EUA, onde o índice varia de 3-5%. Em países menos desenvolvidos, como a África do Sul, essa porcentagem pode chegar aos 54%.

Entre as amostras positivas para *Salmonella*, uma se encontrava congelada e uma era fresca. A presença do patógeno em uma amostra congelada indica que a *Salmonella* consegue sobreviver em baixas temperaturas, como já havia sido observado por Escartín (2000), que demonstrou que embora haja queda no número populacional, esse microrganismo pode se manter por semanas em temperatura de congelamento.

As placas de Baird Parker apresentaram alta contaminação por estafilococos coagulase negativa, ainda abundante na diluição 10^{-4} , indicando a qualidade higiênica ruim do produto. De acordo com Peterson (1962a e 1962b), o crescimento do *S. aureus* é reprimido pela presença de outras populações de bactérias encontradas naturalmente nos alimentos, devido à competição por nutrientes e pela modificação do ambiente para condições menos favoráveis para o seu crescimento. Devido a isso, podemos sugerir que a ausência de ECP ocorreu devido à alta contaminação das amostras por outras bactérias não identificadas neste estudo.

A ausência de *Estafilococos* Coagulase Positiva difere do estudo de Simon (2007), que pesquisou pescados e frutos do mar, na Índia, e detectou a presença de *S. aureus* em 17% de suas amostras. Resultados similares aos dele foram encontrados por Ayulo et al. (1994), Kandgule (2001), Rodma et al. (1991) and Yesudhasan (2000).

Foi encontrada uma maior proporção de peixes e frutos do mar congelados à disposição para os consumidores na cidade de Botucatu, SP, provavelmente pela distância a ser percorrida até Botucatu, que fica a 250 Km de São Paulo. Também pode indicar uma

preferência pelos produtos congelados, pela maior sensação de segurança que transmite aos consumidores.

Alimentos congelados são uma excelente maneira para a conservação dos alimentos em segurança e doenças associadas à alimentos congelados são raros. Entretanto, além de presevar a qualidade dos alimentos, o congelamento também pode permitir a viabilidade de alguns microorganismos patogênicos. A resistência e sobrevivência dos microorganismos quando submetidos à congelamento é de uma ampla variedade. Variando entre bactérias gram-positivas e gram-negativas e entre seus diversos gêneros.(Archer, 2000). Como foi comprovado por Lund (2000), bactérias gram-negativas são mais susceptíveis ao congelamento do que as gram-positivas, porém algumas espécies podem sobreviver bem em alimentos congelados, dependendo da matriz do alimento e de outros fatores. Como já foi observado por Archer (2000), apesar da *Salmonella* ser uma bactéria Gram-negativa, sua resistência à baixas temperaturas é bastante conhecida. *Salmonella* Typhimurium desmontraram continuou estável em peixes congelados a -22°C por mais de um ano (Raj e Liston, 1961).

5. CONCLUSÃO

Apesar de apenas 2% das amostras analisadas estarem em desacordo com a RDC nº12 (2001), isto pode indicar risco à saúde dos consumidores, pois *Salmonella* é um dos principais patógenos responsáveis por doenças ocasionadas por alimentos. Deve ser observada a possibilidade de contaminação cruzada pelo fato de uma das amostras positivas estar no gelo, junto com outros produtos, além do fato de vários peixes e frutos do mar serem consumidos crus.

A presença de *Salmonella* em uma amostra congelada, permite concluir que apesar do congelamento ser uma ótima maneira para conservação, este processo não elimina totalmente os patógenos do alimento.

A população deve estar ciente dos perigos que esses alimentos podem representar, adquirindo somente produtos de boa qualidade, mantendo-os sob refrigeração até o momento do consumo, com o processo térmico adequado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, W.H.; FLOWERS, R.S.; SILLIKER, J. et al. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington: Apha, 2001, 357-380.

ARCHER, D.L.; Freezing: an underutilized food safety technology?. *International Journal of Food Microbiology* 90 (2004) 127–138

AYULO, A. M. R., MACHADO, R. A., & SCUSSEL, V. M. (1994). Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in wash and seafood from the Southern region of Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 24, 171–178.

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

BEAN NH, GOULDING JS, DANIELS MT, ANGULO FJ. Surveillance of foodborne disease outbreaks— United States, 1988–1992. *J Food Prot* 1997; 60: 1265–86.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico sobre "Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Aprovado a Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997 e regulamentado pela Resolução RDC nº 175, 08 de julho de 2003. Brasília, DF, 2003

CDC, Centers of Disease Control and Prevention. Prevention Emerging Infectious Diseases: A Strategy for the 21st Century, 2003. Disponível em <<http://www.cdc.gov/ncidod>> Acesso em: 24 ago. 2007

CDC, Centers of Disease Control and Prevention (2005) Foodborne illness, 2005. Disponível em < <http://www.cdc.gov/ncidod> > Acesso em: 21 mai. 2007

CDC, 2008, Division of foodborne, bacterial and mycotic diseases, Salmonellosis, How common is salmonellosis?, 2008. Disponível em <http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/salmonellosis_gi.html> Acesso em: 11 dez. 2008

CVE, Centro de Vigilância Epidemiologia. Doenças transmitidas por Alimentos, 2003. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/dta_menu.htm> Acesso em: 11 dez. 2008

CVE, Centro de Vigilância Epidemiologia. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos Notificados ao CVE, 2008. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dados/DTAESPjul08.xls>> Acesso em: 10 dez. 2008

D'AOUST J. Y. *Salmonella* and the international food trade. *Int J Food Microbiol* 1994; 24: 11-31.

EDUARDO, M.B.P.; MELLO, M.L.R. Febre Tifóide, 2006. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dta_estat.htm> Acesso em: 22 ago.2007

ESCARTÍN E.F.; LOZANO S.J.; GARCIA O.R. Quantitative survival of native *Salmonella* serovars during storage of frozen raw pork. *International Journal of Food Microbiology* 54 (2000) 19–25

FAO. World Review of Fisheries and Aquaculture, Fisheries Resources: Trends in Production, Utilization and trade, 2003. Disponível em: <<http://fao.org/docrep/003/x8002e04.htm>> Acesso em: 24 set.2007

FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infections*, v.2, p. 1651–1660, 2000.

FDA, Foods and Drugs Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, 2006. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>> Acesso em: 24 ago, 2007

FORSYTHE, S.J. Microbiologia de segurança alimentar. Trad. de Guimarães, M. C. M. e Leonhardt, C. Porto Alegre. Artmed, 2002

FRANCO, BDGM; LANGRAF, M. Microbiologia de Alimentos. São Paulo: Atheneu, 2003

HAMADA SATO, N. et al. Quality assurance of raw fish base on HACCP concept. *Food Control*, v. 16, p. 301-307, 2005.

HUSS, H.H. Assurance of seafood quality. Fisheries and Aquaculture Department. FAO, 1997a.

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

JOSUPEIT, H. Future demand of fish and impact on trade, 2004. Disponível em <<http://www.globefish.org>> Acesso em: 20 ago. 2007

KANDGULE, R.D. (2001). *Incidence of pathogens like Salmonella, Listeria monocytogenes, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, and Vibrio cholerae in seafoods*. M.F.Sc. Dissertation, (87 pp.). CIFT, CIFE, India.

KENT, G. Fisheries, food security and the poor. Food Policy Journal, v. 22, p. 393-404, 1997.

KRUSE, H. Globalization of the supply-food safety implications special requirements: future concerns. Food Control, v. 10, p. 315-320, 1997.

KURIEN J. Tsunamis and a secure future for fishing communities. Ecological Economics, Volume 55, Issue 1, 5 October 2005, Pages 1-4

LANCETTE, G.A; BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins. In: DOWNES F. P; ITO, K. (Eds). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington: Apha, 2001, 387-403

LUND, B.M., 2000. Freezing. In: Lund, B.M., Baird Parker, T.C., Gould, G.W. (Eds.), The Microbiological Safety and Quality of Food, vol. I. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, pp. 122-145.

MAC FADDIN, J. F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Baltimore Maryland : Williams And Wilkins. Xii, 527 P. / 26 Cm.. Edição 2. 1976

MEAD, P. S et al. Food Related Illness and death in the United States. Journal of Emerging Infectious Diseases, v. 5, p. 607-625, 1999.

MOTARJEMI, Y.; KÄFERSTEIN, F. K. Global estimation of foodborne disease. World Health Statistics Quarterly, v. 50, p. 124-131, 1997.

PETERSON, A. C.; BLACK, J. J.; GUNDERSON, M. F. Staphylococci in Competition. Vol. I: Growth of Naturally Occurring Mixed Populations in Precooked Frozen Foods during Defrost. Appl. Microbiol. 10:16-22. 1962a

PETERSON, A. C.; BLACK, J. J.; GUNDERSON, M. F. Staphylococci in Competition. Vol. II: Effect of Total Numbers and Proportion of Staphylococci in Mixed Cultures on Growth in Artificial Culture Medium. Appl. Microbiol. 10:23-30. 1962b

RAJ, H., W. J. WIEBE, AND J. LISTON. Detection and enumeration of fecal indicator organisms in frozen sea foods. Appl. Microbiol. 9:295-303. 1961

REIJ, M. W.; DEN AANTREKKER, E. D; Recontamination as a source of pathogens in processed foods. International Journal of Food Microbiology, v. 91, p. 1-11, 2004.

Rodma, P., Satjapala, T., & Suwanvitaya, P. (1991). *Staphylococcus aureus* occurrence in frozen foods. *Food*, 21(3), 197–204.

SEAP, Secretaria de Aquicultura e Pesca. O diagnóstico da pesca extrativa no Brasil, 2006. Disponível em: < http://www.presidencia.gov.br/estrutura_presidencia/seap/pesca/> Acesso em: 11 dez. 2008

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

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

THEYS, T. E. et al. Effect of pH, water activity and gel micro-structure, including oxygen profiles and rheological characterization, on the growth kinetics of *Salmonella Typhimurium*. International Journal of Food Microbiology Volume 128, Issue 1, 30 November 2008, Pages 67-77

WHO, World Health Organization. Foodborne diseases, emerging. Fact sheet n° 237, 2007. Disponível em < <http://www.who.int/en/> > Acesso em: 22 ago.2007

WHO, World Health Organization. Food safety and foodborne illness. Fact n° 237, 2007. Disponível em < <http://www.who.int/en/> > Acesso em: 22 ago.2007

Yesudhasan, P. (2000). *Bacterial quality of shrimp processed in factories for export to European Union*. M.F.Sc. Dissertation, (87 p.). CIFT, CIFE, Mumbai India.