

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO GELO  
UTILIZADO NA CONSERVAÇÃO DE PESCADO**

Juliana Cristina Baldin  
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO GELO  
UTILIZADO NA CONSERVAÇÃO DE PESCADO**

Juliana Cristina Baldin

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho – 2011

Baldin, Juliana Cristina  
B177a Avaliação da qualidade microbiológica do gelo utilizado na  
conservação de pescado / Juliana Cristina Baldin. -- Jaboticabal,  
2011  
xi, 39 f.; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011  
Orientador: Oswaldo Durival Rossi Junior  
Banca examinadora: Angela Cleusa de Fátima Banzatto de  
Carvalho, Laudicéia Giacometti Lopes  
Bibliografia

1. Gelo. 2. Pescado. 3. Qualidade microbiológica. I. Título. II.  
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619: 663.6: 576.8

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**JULIANA CRISTINA BALDIN** – nascida em 26 de fevereiro de 1984, no município de Leme – SP, filha de João Caetano Baldin e Antonia Maria Cecília Marchetti Baldin. Ingressou em fevereiro de 2002 no curso de Medicina Veterinária na Faculdade Anhanguera Educacional – Câmpus Leme, concluindo-o em dezembro de 2006. Realizou estágio curricular em 2006 e atuou como profissional em 2007 no hipermercado Carrefour Ltda. em Ribeirão Preto/SP, realizando o controle de qualidade dos produtos de origem animal e frequentou o Curso de Capacitação para Médicos Veterinários Responsáveis Técnicos em Estabelecimentos Produtores de Alimentos de Origem Animal em 2008. Em março de 2009 iniciou o Curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de Medicina Veterinária Preventiva, na FCAV – UNESP – Jaboticabal/SP.

*"E ainda se vier noites traiçoeiras,  
se a cruz pesada for, Cristo estará contigo.  
O mundo pode até fazer você chorar,  
mas Deus te quer sorrindo".*

*Carlos Papae.*

Dedico

Aos meus pais João e Cecília por todo amor, apoio, confiança e por acreditarem no meu sucesso.

Aos meus irmãos Isabel e João Carlos que sempre me apoiaram.

Aos meus avós Valentim (*in memoriam*) e Lourdes que foram sempre muito acolhedores. Muito obrigada.

## **Agradeço**

A Deus pelo dom da vida e pelas oportunidades concedidas.

Aos meus pais, João e Cecília, os verdadeiros responsáveis por toda essa caminhada.

À minha irmã Isabel e meu irmão João Carlos por respeitarem minha escolha em busca de novos conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior pela confiança, ajuda, amizade e orientação na elaboração deste trabalho. Muito obrigada professor Duri.

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto Amaral e à Profa. Dra. Ângela Cleusa de Fátima Banzatto de Carvalho pelas ajudas e contribuições para melhora deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório, Liliana Biondi Naka (Lila) e Waldemar Dibelli Junior (Diba), pelos ensinamentos e ajuda prestada.

À Fernanda Senter Magajevski por toda ajuda e apoio para meu ingresso no mestrado. Muito obrigada, Fer.

À Lucimara Antonio Borges (Pinga) minha companheira de mestrado, conselheira e minha amiga em todos os momentos, eu serei eternamente grata por você ter feito parte da minha vida. Muito obrigada!

À minha nova família: República Abduzidas (Taxinha, Papete, Cidynha, Maloca, Traçada, Aôtra, Xepa, Dipirona, Sá-Cumé, Denise, Salete e antigas moradoras: Porka,

Mimela, Arriba e K-oral) que me acolheram e me ensinaram o verdadeiro valor de uma boa convivência, tudo o que conquistei neste período devo a vocês. Amo muito todas!

À Diana Cifuentes Sanches também companheira de mestrado. Muito obrigada pela amizade sincera.

Aos colegas de laboratório Rejeana, Fernanda, Pedro, Natália, Viviane, Kelly, Mônica, Raquel, Isabel, Mayhara, Fabiana, José Roberto, Camila, Poliana, Bruna, Gian e Maurício. Muito obrigada por todo o carinho e ajuda.

Às minhas irmãs de faculdade Gisele, Idivane e Luciane, que mesmo longe sempre me apoiaram. Amo vocês!

Às minhas amigas-irmãs Fabiana, Fernanda e Natália pela amizade e maravilhoso convívio. Amo vocês demais!

Às minhas amigas Andréa, Débora, Lavínia, Rosiane e Lucenir, que sempre me compreenderam e me acolheram.

À minha amiga Carla Ulian, por todo apoio e pela amizade sincera.

Aos funcionários da biblioteca em especial a Tieko e a Núbia pela ajuda prestada.

Aos responsáveis pelos estabelecimentos estudados por permitirem a realização deste trabalho.

Aos demais professores e funcionários do departamento de Medicina Veterinária Preventiva pela feliz convivência.

A todos os amigos que encontrei nesta caminhada o meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELAS .....	ix
RESUMO .....	x
SUMMARY .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. OBJETIVOS .....	02
2.1 Objetivo geral .....	02
2.2 Objetivos específicos .....	02
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	03
3.1 Coliformes totais, termotolerantes e <i>Escherichia coli</i> .....	10
3.2 <i>Staphylococcus</i> sp. ....	11
3.3 <i>Salmonella</i> spp. ....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	15
4.1 Caracterização dos locais de colheita e amostras utilizadas .....	15
4.2 Metodologia empregada .....	16
4.2.1 Preparo das diluições das amostras .....	16
4.2.2 Contagem padrão em placas de microrganismos heterotróficos aeróbios ou facultativos, mesófilos e psicrotrotóxicos viáveis .....	16
4.2.3 Determinação do NMP de coliformes totais .....	17
4.2.4 Determinação do NMP de coliformes termotolerantes e <i>Escherichia coli</i> .....	17
4.2.5 Contagem de <i>Staphylococcus</i> sp. ....	18
4.2.6 Isolamento de bactérias do gênero <i>Salmonella</i> .....	19
4.2.7 Determinação da concentração de cloro residual e do pH .....	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
6. CONCLUSÕES .....	29
7. REFERÊNCIAS .....	30
8. ANEXO 1 .....	38

9. ANEXO 2 .....	39
------------------	----

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Padrão microbiológico para potabilidade da água de acordo com a Portaria nº 518 de 25/03/2004 do Ministério da Saúde .....	08
<b>Tabela 2.</b> Distribuição das amostras de gelo utilizado na conservação de pescado, colhidas durante o período de novembro/2009 a outubro/2010, segundo as populações de microrganismos heterotróficos mesófilos .....	21
<b>Tabela 3.</b> Distribuição das amostras de gelo utilizado na conservação de pescado, colhidas durante o período de novembro/2009 a outubro/2010, segundo as populações de microrganismos heterotróficos psicrotóxicos.....	23
<b>Tabela 4.</b> Distribuição das amostras de gelo utilizado na conservação de pescado, colhidas durante o período de novembro/2009 a outubro/2010, segundo as populações de coliformes totais e coliformes termotolerantes .....	24
<b>Tabela 5.</b> Distribuição das amostras de gelo utilizado na conservação de pescado, colhidas durante o período de novembro/2009 a outubro/2010, segundo as populações de <i>Staphylococcus</i> sp. e <i>S. aureus</i> .....	26
<b>Tabela 6.</b> Resultados médios dos teores de cloro e valores de pH em amostras de gelo adquiridas durante o período de novembro/2009 a outubro/2010.....	28

## **AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO GELO UTILIZADO NA CONSERVAÇÃO DE PESCADO**

**RESUMO** - O gelo é um excelente meio de prolongar o frescor do peixe e na indústria alimentícia tem um dos mais importantes papéis, uma vez que retarda a multiplicação bacteriana e, se fabricado sob más condições sanitárias pode se tornar um fator de risco para os consumidores. Sendo assim, este estudo objetivou avaliar a qualidade microbiológica do gelo utilizado na conservação do pescado por meio da quantificação de microrganismos heterotróficos mesófilos e psicrotóticos viáveis, coliformes totais e termotolerantes, além de investigar a presença de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. Para tal, foram colhidas 63 amostras de gelo de seis estabelecimentos, sendo cinco hipermercados e uma peixaria, situados no município de Ribeirão Preto/SP. Os resultados obtidos mostraram populações de microrganismos heterotróficos mesófilos variando entre  $1,0 \times 10$  e  $3,0 \times 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> e psicrotóticos variando entre  $1,0 \times 10$  e  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL, sendo que 19,05% das amostras contendo microrganismos mesófilos encontravam-se com populações acima do permitido pela legislação vigente. Já 22,22% das amostras foram positivas para coliformes totais e 9,52% para coliformes termotolerantes. A presença de *Staphylococcus aureus* foi confirmada em três amostras, *E. coli* e *Salmonella* spp. não foram encontradas. Portanto, a avaliação da qualidade microbiológica do gelo, neste experimento, permitiu concluir que a água utilizada na fabricação de gelo utilizado para conservação de pescado comercializado nos estabelecimentos pode ser contaminada por manuseio inadequado e seu incorreto acondicionamento, o que é um fator de risco para a saúde do consumidor uma vez que o gelo em contato com o peixe pode contaminá-lo.

**Palavras-chave:** pescado, gelo, qualidade microbiológica, bactérias patogênicas.

## EVALUATION OF THE MICROBIOLOGICAL QUALITY OF THE ICED USED IN THE CONSERVATION OF SEAFOOD

**SUMMARY** - The ice is an excellent way to prolong the freshness of the fish and in the food industry has one of the most important roles, since it slows the bacterial growth, and if it is manufactured under poor sanitary conditions could become a risk factor for consumers. So, this study had as objective to evaluate the microbiological quality of the ice used in the seafood conservation by counting of mesophilic and psychrotrophics, total and thermoresistant coliforms and to investigate the presence or not of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. For such, sixty-three samples of ice were collected from five supermarkets and one fish market located in the municipality of Ribeirão Preto/SP. The results showed populations of mesophilic heterotrophic microorganisms ranging from  $1,0 \times 10$  to  $3,0 \times 10^4$  UFC/mL and psychrotrophics ranging from  $1,0 \times 10$  to  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL, being 19,05% of the samples containing mesophilic microorganisms above the allowed by the current legislation. It was found that 22,22% of the samples were positive for total coliforms and 9,52% for thermoresistant. The presence of *Staphylococcus aureus* was confirmed in three samples and *E. coli* and *Salmonella* spp. were not found. So, the evaluation of the microbiological quality in this study permitted to conclude that though there is a specific legislation about water quality, the unpotable water still in use in the ice manufactured utilized in the seafood conservation commercialized in food stores, what is a risk factor to the consumers health since the ice in contact with the fish can contaminate it.

**Key-words:** seafood, ice, microbiology, pathogenic bacteria.

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças de natureza infecciosa ou tóxica, devido à ingestão de alimentos ou água contaminados, ocorrem há tempos e são responsáveis por grandes surtos de toxinfecções alimentares, sendo as crianças, idosos e os imunodeprimidos mais acometidos. Porém, esses surtos são pouco relatados, visto que o diagnóstico dessas doenças é difícil, devido às raras investigações.

Em relação ao pescado, o baixo consumo indica menores registros de surtos alimentares quando comparados às aves, laticínios e outras carnes. Porém, o aumento que se tem observado no seu consumo, devido a benefícios como, por exemplo, redução de doenças cardíacas, tem implicado também no aumento da sua produção. Entretanto, é bastante perecível, sua captura até o consumo exige condições sanitárias adequadas, pois além da rápida deterioração autolítica, microrganismos podem estar presentes.

Dessa forma, a conservação desses produtos requer um controle de qualidade e uma manutenção da cadeia de frio mais rigorosas. A correta utilização do gelo tem a função de manter o frescor do pescado, o qual deve permanecer sob temperaturas próximas de 0°C, e, a água utilizada na sua fabricação deve estar de acordo com os padrões de potabilidade preconizados na Portaria n°518/2004/MS, tais como, ausência de coliformes termotolerantes em 100mL e contagem de microrganismos heterotróficos mesófilos de até 500 UFC.mL<sup>-1</sup> (BRASIL, 2004).

Tendo em vista o exposto realizou-se o presente trabalho que tem como objetivos o que se segue.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral:**

- avaliar a qualidade microbiológica do gelo utilizado na conservação do pescado.

### **2.2. Objetivos específicos:**

- quantificação de microrganismos heterotróficos mesófilos e psicrotroticos viáveis;
- quantificação de coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli*;
- quantificação de *Staphylococcus aureus*;
- determinação da presença de *Salmonella* spp;
- determinação das concentrações de cloro residual livre e o valor de pH;
- avaliar as características microbiológicas de gelo frente aos padrões legais de acordo com a Portaria nº518/2004/MS (BRASIL, 2004).

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são conhecidas desde épocas muito remotas. No ano 2000 a.C. Moisés determinou algumas leis sobre os alimentos que poderiam ser ingeridos e aqueles que deveriam ser rejeitados, bem como métodos de preparação e a importância da limpeza das mãos antes de ingeri-los, entretanto, sua contaminação estava relacionada com seu estado de putrefação. Hoje, sabe-se que os alimentos contaminados por microrganismos patogênicos podem ter aspecto, odor e sabor normais (BRASIL, 2005).

As DTAs são definidas como doenças de natureza infecciosa ou tóxica causadas pela ingestão de alimentos ou água contaminados e são responsáveis por aproximadamente 90% dos casos de diarreia que ocorrem nos países em desenvolvimento (WHO, 2004).

Atualmente, mais de 250 tipos diferentes de DTAs têm sido descritas e as mais conhecidas são: cólera, febre tifóide, botulismo, salmonelose, estafilococose e colibacilose. A suscetibilidade é maior em crianças, idosos e imunodeprimidos e o período de incubação varia conforme o agente etiológico podendo durar de horas a meses (BRASIL, 2005).

A incidência global é difícil de estimar, mas há relatos que 1,8 milhão de pessoas morreram pelo agravamento devido a doenças diarreicas no ano de 2005, sendo que grande parte desses casos pode ter sido atribuída à contaminação de alimentos ou água, além disso, pesquisas mostram a diarreia como uma das principais causas de desnutrição em lactantes e crianças (WHO, 2011). Há indicação que a ocorrência destas doenças vem aumentando gradativamente e que são responsáveis por centenas de mortes e milhares de hospitalizações (GERMANO & GERMANO, 2001).

As DTAs veiculadas por pescado ocorrem em menor proporção quando comparadas às transmitidas por meio de aves, laticínios e outras carnes. A dieta da população em busca de um alimento saudável e a forma de preparo do pescado, muitas vezes crus ou mal-cozidos, são fatores determinantes da importância desse alimento como veículo de transmissão de patógenos (HUSS et al., 2000). Segundo a Secretaria

de Vigilância em Saúde, no Brasil foram registrados 3.737 surtos de doenças veiculadas por alimentos entre os anos de 1999 a 2004, sendo que 37 foram causados pelo consumo de pescado contaminado (BRASIL, 2005).

A produção de pescado no Brasil teve um aumento de 7,3%, passando de 1.156.423 toneladas em 2008 para 1.240.813 toneladas em 2009. O consumo per capita no país em 2009 foi de 9,03 Kg/habitante/ano, apresentando um crescimento de 8% em relação ao ano anterior. No entanto, ainda abaixo dos 12 kg/habitante/ano recomendados como consumo mínimo pela Organização Mundial da Saúde. Nas regiões Sul e Sudeste que concentram 57% da população brasileira são observados índices muito abaixo do esperado 1,78 e 2,17 kg/habitante/ano, respectivamente, com predomínio de pescado de água salgada e somente na região norte do país o consumo fica próximo ao ideal. (BRASIL, 2008/2009).

Conforme o Decreto nº30.691/1997 define-se pescado como um termo genérico que compreende os peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, quelônios e mamíferos de água doce e salgada usados na alimentação humana e é classificado como: (1) pescado fresco, aquele que não sofreu processo de conservação, exceto a ação do gelo; (2) resfriado, quando acondicionado em gelo e mantido em temperaturas entre -0,5°C a -2°C; e (3) congelado, o tratado por processos adequados de congelação em temperatura não superior a -25°C (BRASIL, 1997).

O amplo crescimento da aquicultura no Brasil chama atenção para suas consequências à saúde do consumidor devido, principalmente, ao consumo de produtos na forma de “sushi”, “sashimi”, ostras ou pelo cozimento inadequado de peixes (VIEIRA & SAKER-SAMPAIO, 2004).

O pescado trata-se de um alimento rico em proteínas, responsáveis pelo alto valor nutritivo com um balanceamento de aminoácidos essenciais, em especial a lisina, e lipídeos, que servem como fonte energética e de ácidos graxos polinsaturados, ressaltando-se o ômega três ( $\omega$ 3) que apresentam efeitos redutores sobre os teores de triglicerídeos e colesterol sanguíneo, reduzindo os riscos de doenças cardiovasculares. Além disso, o pescado pode ser também uma excelente fonte de vitaminas e minerais (OGAWA & MAIA, 1999).

Embora seja considerado um alimento saudável, o seu consumo no Brasil, considerado baixo segundo a OMS, pode estar relacionado à comercialização mal feita e à má qualidade do produto disponível ao consumidor. Dessa forma, cabe aos responsáveis pela qualidade do pescado: autoridades governamentais, pescadores, aquicultores, transportadores da matéria-prima, indústrias processadoras, atacadistas e varejistas, desempenharem seus papéis quanto à correta captura, manipulação e conservação para que se possa fazer do pescado um alimento de excelência nutricional, confiável sob o ponto de vista do consumidor, de qualidade e em concordância com os parâmetros exigidos pela legislação vigente (GALVÃO, 2006).

Nesse contexto, PIMENTEL & PANETTA (2003) analisaram 80 amostras de gelo para conservação de pescado no município de São Paulo e encontraram populações de microrganismos heterotróficos que variaram de  $3,0 \times 10^3$  a  $8,4 \times 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>, concluindo que os resultados encontrados acima do permitido pela legislação são devido às práticas inadequadas de higiene e a má qualidade da água utilizada para sua fabricação.

Já ALMEIDA FILHO et al. (2002), ao avaliarem a qualidade microbiológica do peixe pintado (*Pseudoplatystoma fasciatum*) comercializado no município de Cuiabá/MT, observaram altas populações de microrganismos psicrotóxicos em amostras colhidas em feiras livres e supermercados. Os resultados caracterizaram a presença de grande carga microbiana como falhas na cadeia produtiva que, provavelmente, ocorreram desde a captura, passando por manipulação, estocagem, transporte e comercialização o que colocou em risco a integridade dos produtos.

Um ponto importante a ser abordado é a conservação desses produtos com rigoroso controle de qualidade dando máxima atenção à manutenção da cadeia de frio, de forma que sejam mantidos em locais limpos e sob temperatura controlada (ALVES et al., 2002). Desta forma, o gelo tem sido usado como um excelente meio de prolongar o frescor do pescado, uma vez que as baixas temperaturas são utilizadas para retardar reações químicas e a ação das enzimas, além de minimizar ou parar a atividade dos microrganismos no alimento (VIEIRA et al., 1997; SCHERER et al., 2004; VIEIRA & SAKER-SAMPAIO, 2004).

Cada microrganismo apresenta uma temperatura mínima para o seu desenvolvimento, abaixo da qual não terá condições para se multiplicar, por outro lado, quando submetidos à temperatura ótima para seu desenvolvimento, podem provocar mudanças no aspecto, sabor e, às vezes, no odor do substrato afetado. Sendo assim, temperaturas de resfriamento que envolvam gelo ou refrigeração mecânica são indicadas, tanto como o principal método de conservação, quanto numa preservação temporária até que outro processo seja aplicado (VIEIRA & SAKER-SAMPAIO, 2004).

A indústria brasileira utiliza gelo em cubos ou em escamas, os quais devem ter no máximo um cm<sup>3</sup>, com uma relação gelo/pescado na proporção de 1:4 a 1:1. Além disso, o excesso de pescado que não for imediatamente processado na indústria ou varejo deve ser conservado em caixas de policloreto de vinila (PVC) rígido com camadas intercaladas e armazenado em câmaras refrigeradas por até três dias (SCHERER et al., 2004; GALVÃO, 2006).

O gelo pode conter microrganismos patogênicos quando uma fonte de água contaminada é utilizada na sua produção ou se houver falhas de higiene no seu manuseio. Como exemplo, na Tailândia (2005), um surto de Hepatite A afetou aproximadamente novecentas pessoas após o consumo de gelo produzido numa fábrica na província de Chiang Rai proveniente de poços artesianos contaminados (FEHD, 2005).

Os resultados para microrganismos heterotróficos em amostras analisadas por VIEIRA et al. (1997) evidenciaram populações acima da permitida na legislação em supermercados de Fortaleza/CE. Esses autores relataram que o uso de água contaminada durante o processamento e/ou transporte resultou em má qualidade do gelo. No mesmo município, ALBUQUERQUE et al. (2006) observaram *Staphylococcus aureus* em amostras de gelo utilizado na conservação de camarão em feiras livres.

FALCÃO et al. (2002, 2004) em Araraquara/SP encontraram grande percentual de amostras contaminadas com elevadas populações de microrganismos mesófilos e psicrotróficos, além de *Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli*, inclusive com sorotipos enteroagregativos, o que os levou a chamarem a atenção sobre a importância da

qualidade microbiológica do gelo para a conservação de alimentos, já que o mesmo, na maioria das vezes, entra em contato direto com os produtos.

Os microrganismos heterotróficos psicrotróficos possuem a capacidade de produzir enzimas deteriorantes e têm grande importância em microbiologia de alimentos, uma vez que podem se desenvolver em produtos conservados sob refrigeração, mesmo em temperaturas próximas a 0°C (JAY, 2005).

LATEEF et al. (2006) ao avaliarem as características microbiológicas do gelo utilizado na conservação de alimentos e em bebidas em Ogbomoso (Nigéria) encontraram altos níveis de contaminação, prevalecendo microrganismos como *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus firmus*, inclusive com culturas resistentes a antimicrobianos de uso comum e entenderam que ele pode ser considerado como um novo veículo de disseminação de microrganismos.

A água deve ser potável, nesse contexto, GALAL-GORCHEV (1996) citado por CASTANIA (2009), nos países em desenvolvimento, nos quais se enquadra o Brasil, estimou que 80% das doenças e mais de um terço das mortes estavam associadas ao emprego e consumo de águas contaminadas.

A relação dessa contaminação com as doenças humanas enfatiza a importância de estudos para obter informações sobre as condições higiênicas do gelo comercial, pois a água não deve apresentar microrganismos patogênicos que possam permanecer viáveis durante a armazenagem. Segundo RIES et al. (1992), citados por FALCÃO et al. (2002), o gelo foi um dos mais importantes veículos de transmissão de cólera durante a epidemia que ocorreu no Peru na última década, o qual foi preparado a partir de água contaminada, misturado com xarope de groselha e vendido por vendedores ambulantes.

A esse respeito, altas populações de microrganismos heterotróficos, bem como a presença de coliformes totais e termotolerantes, foram observadas por GIAMPIETRO & REZENDE-LAGO (2009) em Ribeirão Preto/SP no gelo utilizado para conservação de pescado, o que os levou a concluir que ele traz riscos ao produto armazenado e à população consumidora e que uma das formas de amenizar o problema é a orientação dos manipuladores de alimentos oferecendo cursos de capacitação.

Da mesma maneira, em São Carlos/SP, SERRANO & SOUSA (2006) confirmaram a presença de microrganismos heterotróficos, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp. e *Staphylococcus* coagulase positivo em gelo proveniente de bares e restaurantes, sugerindo a contaminação da água ou manipulação inadequada. Além disso, por meio da aplicação de questionários próprios constataram que a maioria dos manipuladores não reconhecia o gelo como potencial veiculador de doenças alimentares.

Segundo a Portaria nº518 de 25/03/2004, o Ministério da Saúde caracteriza como água potável, aquela cujos parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos atendam ao padrão de potabilidade com isenção de bactérias patogênicas e em conformidade com o padrão microbiológico descrito na Tabela 1. Além disso, de acordo com a Portaria nº326 de 30/07/1997/MS, o gelo utilizado em contato direto com alimentos ou superfícies não deve conter nenhuma substância que possa contaminá-lo ou ainda ser perigosa para a saúde do consumidor, para tanto, deve obedecer ao padrão de água potável quanto à identidade e qualidade vigentes (BRASIL, 1997; BRASIL, 2004).

**Tabela 1.** Padrão microbiológico para potabilidade da água de acordo com a Portaria nº 518 de 25/03/2004/MS.

Água Potável	
Parâmetro	VMP*
Coliformes totais	Sistemas que analisam menos de 40 amostras por mês: apenas uma amostra poderá apresentar mensalmente resultado positivo em 100mL
<i>Escherichia coli</i> ou coliformes termotolerantes	Ausência em 100 mL
Microrganismos heterotróficos mesófilos	$\leq 500 \text{ UFC.mL}^{-1}$ **

\* Valor máximo permitido

\*\* Unidade formadora de colônia por mililitro

O gelo, apesar de não ser um meio de cultivo, devido à falta de nutrientes necessários ao desenvolvimento microbiano, poderá funcionar como um veículo de contaminação ao pescado e comprometer sua qualidade, caso seja preparado a partir de água contaminada por microrganismos que suportem temperaturas próximas a 0°C (VIEIRA & SAKER-SAMPAIO, 2004). O uso do cloro na água destinada à sua produção é recomendado como ferramenta efetiva na redução de microrganismos no pescado, o que foi constatado por SCHERER et al. (2004) que ampliou em até três dias a vida de prateleira da carne de carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*) utilizando gelo clorado.

O cloro, considerado como um desinfetante universal para a água na indústria de pescado, é amplamente utilizado para a limpeza de superfícies, utensílios e matéria-prima, e a parte que permanece na água após período de ação média de 20 minutos, constitui o cloro livre, de grande poder desinfetante. Soluções contendo altas concentrações de ácido hipocloroso, que é formado quando compostos clorados estão em solução aquosa, apresentam uma maior atividade bactericida. A eficiência do cloro diminui com o aumento do pH da solução. A desinfecção da água tem como objetivo destruir bactérias patogênicas e outros microrganismos e é uma das mais importantes medidas de saúde pública, considerando que a sua prática tem reduzido, significativamente, doenças propagadas pela água (DOMINGUES & LANGONI, 2001; SCHERER et al., 2004; SILVA et al., 2009).

A Portaria nº518/2004/MS preconiza que após a desinfecção a água deve conter um mínimo de cloro residual livre de 0,5 mg/mL, sendo obrigatória a manutenção de 0,2 mg/mL em qualquer ponto da rede de distribuição, recomendando-se que a cloração seja realizada em pH inferior a 8,0 e com um tempo de contato mínimo de 30 minutos (BRASIL, 2004). Em geral, a reatividade do cloro diminui com o aumento do pH, e sua velocidade de reação aumenta com a elevação da temperatura (MEYER, 1994).

PIMENTEL & PANETTA (2003) observaram pH entre 4,88 e 6,98 ao avaliarem gelo antes do contato com o pescado em supermercados de São Paulo/SP, resultados que podem favorecer a multiplicação bacteriana no gelo. Da mesma forma, GIAMPIETRO & REZENDE-LAGO (2009) relataram 29 (96,6%) amostras em desacordo quanto ao teor de cloro residual e 12 (40%) quanto ao pH em amostras de

gelo para conservação de pescado em Ribeirão Preto/SP, o que indicou riscos ao produto armazenado neste gelo, bem como à população consumidora.

### **3.1. Coliformes Totais, Coliformes Termotolerantes e *Escherichia coli***

Pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, predominando os gêneros *Escherichia* sp., *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp. e *Klebsiella* sp., os coliformes são encontrados no ambiente ou no trato gastrointestinal de animais homeotérmicos e foram historicamente utilizados como microrganismos indicadores para servir como uma medida de contaminação fecal e, assim, avaliar a possível presença de patógenos entéricos na água. No entanto, a presença de bactérias desse grupo não indica, necessariamente, a contaminação fecal, sendo importante a contagem de coliformes termotolerantes que indicam as condições sanitárias e possível presença de enteropatógenos no alimento (FALCÃO et al., 2002; FORSYTHE, 2002).

A identificação da *Escherichia coli* em alimentos é de grande valor devido à relação com os surtos de gastroenterite observados, sendo os coliformes termotolerantes capazes de fermentar a lactose em meio *Escherichia coli* (EC) com produção de gás a 45,5 °C (AGNESE et al., 2001; FEHD, 2005).

As estirpes de *Escherichia coli* incluem vários patógenos emergentes de importância para a saúde pública mundial que são classificadas de acordo com suas propriedades e os sintomas produzidos no hospedeiro, tais como *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E.coli* enteroinvasiva (EIEC), *E.coli* enterohemorrágica (EHEC), *E.coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (FALCÃO et al., 2002).

De acordo com AGNESE et al. (2001), por não fazer parte da microbiota normal do pescado, a *E. coli* pode estar associada à contaminação fecal do local de captura, transporte e manuseio, ou mesmo do gelo utilizado e outros materiais que tenham entrado em contato com o mesmo, uma vez que sua presença indica condições sanitárias insatisfatórias. Essas observações foram confirmadas por ALVARES et al.

(2008) os quais encontraram *E. coli* em 48,9% das amostras de pescado colhidas na grande São Paulo/SP.

MURATORI et al. (2007) analisaram amostras de lavados de mãos de manipuladores de piscicultura e isolaram *E. coli* das amostras, confirmando que esses microrganismos podem ser veiculados por mãos.

Na Índia, KUMAR et al. (2005) analisaram 10 amostras de gelo de diferentes mercados de peixes frescos, sendo sete (70%) positivos para *E. coli*. Isso mostrou que ele apresentava má qualidade e serviu como veículo de contaminação para os peixes comercializados neste local.

Resultados acima do padrão estabelecido pela legislação vigente foram comprovados por RODRIGUES NETO et al. (2009) em 27 amostras de gelo comercializados em Recife/PE que confirmaram 15 (55,5%) amostras positivas para coliformes totais e, dentre essas, 14 (93,3%) positivas para coliformes termotolerantes, identificando a presença da bactéria *Klebsiella pneumoniae*, justificada pelo contato com microrganismos em algum dos estágios de fabricação.

Os resultados da análise microbiológica do gelo utilizado para refrigerar bebidas na Irlanda, em 2002, comprovaram a presença de 5% de *E. coli* e 29,5% de coliformes totais, não cumprindo os critérios microbiológicos especificados pela legislação de água potável daquele país indicando que sua contaminação pode surgir a partir de diferentes locais, como a fonte de água e más práticas de higiene alimentar (FSAI, 2002).

### **3.2. *Staphylococcus* sp.**

Os *Staphylococcus* sp. são cocos Gram positivos, com aproximadamente 1 µm de diâmetro e que tendem a formar agrupamentos em arranjos semelhantes a cachos de uva, o que determina o seu nome, pois as palavras gregas *staphyle* e *kokkos* servem para designar cachos de uva e grão, respectivamente (QUINN et al., 2005).

São habitantes usuais da pele, das membranas mucosas e do trato respiratório superior, destacando-se o *S. aureus*, um organismo coagulase-positivo, catalase-positivo, oxidase-negativo e anaeróbio facultativo (GERMANO & GERMANO, 2001).

Sua temperatura de multiplicação varia de 7,0 a 48°C, sendo a temperatura de 37°C considerada ótima e o pH para seu desenvolvimento fica entre 4,0 e 9,8 (BARRETO, 2004).

É considerado como um dos patógenos humanos mais importantes e, apesar de constituir parte da microbiota humana normal, pode produzir infecções oportunistas significativas em condições apropriadas (KONEMAN et al., 2008). Nesse contexto, MURATORI et al. (2007) verificaram a presença desse microrganismo em amostras de mãos de manipuladores em pisciculturas no Piauí, refletindo a possibilidade da veiculação do mesmo ao peixe e seu posterior consumo podendo provocar intoxicações estafilocócicas.

EVANGELISTA-BARRETO & VIEIRA (2003) confirmaram a presença da bactéria em 36 (60%) amostras provenientes de mãos de manipuladores de alimentos em duas indústrias de pescado de Fortaleza/CE e concluíram que a ausência de hábitos adequados de higiene pessoal justificou os altos percentuais encontrados.

As enterotoxinas produzidas por esta bactéria são responsáveis por frequentes casos de intoxicações alimentares. Por outro lado, algumas cepas não produtoras de coagulase estão envolvidas em uma variedade de infecções humanas e animais e apesar de raramente serem implicadas em intoxicações alimentares podem contaminar os alimentos e tornar os seres humanos portadores comuns desses microrganismos (CUNHA et al., 2006).

Segundo CUNHA NETO et al. (2002), a intoxicação alimentar provocada pelo *S. aureus* ocorre devido à ingestão de enterotoxinas produzidas e liberadas durante sua multiplicação no alimento representando um risco para a saúde pública. A enterotoxina estafilocócica termoestável está presente no alimento mesmo após o cozimento e é responsável por aproximadamente 45% das toxinfecções no mundo.

No passado, os estafilococos coagulase negativos foram considerados contaminantes de pouca importância clínica. Entretanto, no decorrer das últimas quatro décadas, esses microrganismos passaram a ser reconhecidos como respeitáveis agentes de doenças humanas (KONEMAN et al., 2008).

De acordo com LAMAITA (2003) os padrões legais para alimentos especificam apenas a presença de espécies coagulase positivas e reforçam a necessidade de revisão da legislação brasileira, incluindo *Staphylococcus* coagulase negativo, dada sua gravidade do ponto de vista de segurança alimentar.

### **3.3. *Salmonella* spp.**

*Salmonella* spp. é uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*, Gram-negativa, anaeróbia facultativa, não formadora de esporos, catalase-positiva, oxidase-negativa, redutora de nitrito a nitrato e a maioria dos sorotipos são móveis, com flagelos peritríquios. Fermenta a glicose, produzindo ácido e gás, porém é incapaz de metabolizar a lactose e a sacarose. Sua temperatura de multiplicação varia de 5°C a 46°C com temperatura ótima de crescimento de 38°C e o pH para multiplicação fica próximo de 7,0, porém valores abaixo de 4,0 e acima de 9,0 são bactericidas (GERMANO & GERMANO, 2001; FORSYTHE, 2002; FORTUNA & FRANCO, 2005).

As infecções provocadas pelas bactérias do gênero *Salmonella* são universalmente consideradas como as mais importantes causas de doenças transmitidas por alimentos. A cada ano, estima-se que ocorram um milhão e 400 mil casos de salmonelose em seres humanos nos Estados Unidos (GERMANO & GERMANO, 2001; KONEMAN et al., 2008). Ela não existe originalmente no pescado, sendo introduzida durante a manipulação ou por contato com águas contaminadas, por meio das bacias pesqueiras e descargas de efluentes de esgotos, representando uma importante via de transmissão dessas bactérias para os peixes e constituindo um grande problema para a saúde pública, devido ao seu caráter patogênico. Segundo a legislação vigente RDC nº12 de 02/01/2001/MS, sua pesquisa é qualitativa, pois verifica se há a presença ou ausência do microrganismo, sendo que, nenhum alimento pode conter *Salmonella* em 25 g de amostra (BRASIL, 2001).

Os resultados de LAGAGGIO et al. (2002) e FARIAS & FREITAS (2008) confirmaram o exposto quanto à ausência de microrganismos do gênero *Salmonella* em mãos de funcionários e pescado analisados.

FALCÃO et al. (2002) isolaram uma amostra de *Salmonella* Enteritidis em gelo utilizado para conservar alimentos em Araraquara/SP. Esses resultados demonstraram ser um importante veículo de contaminação por enterobactérias patogênicas oferecendo risco ao consumidor, por isso, deve ser fabricado e mantido em condições higiênicas e sanitárias adequadas.

MURATORI et al. (1994) e LOURENÇO et al. (2006) avaliaram as condições higiênicas e sanitárias de amostras de peixes comercializados no mercado central de Teresina/PI e amostras de carne de caranguejo-uça comercializadas em São Caetano de Odivelas e Belém/PA, respectivamente, e confirmaram a presença de amostras com *Salmonella* spp., resultados que demonstram a falta de higiene e a contaminação do pescado.

De acordo com ALVARES et al. (2008), parte do pescado comercializado na grande São Paulo foi considerada imprópria para consumo, pois foram encontradas amostras contaminadas por *Salmonella* spp. Da mesma forma, ALMEIDA FILHO et al. (2002) confirmaram a presença de *Salmonella* spp. em amostras de pescados comercializados em supermercados e submetidos à refrigeração (gelo), apresentando-se como alimentos produzidos sob condições higiênicas e sanitárias insatisfatórias e potencialmente capazes de causar enfermidade alimentar.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Caracterização dos locais de colheita e das amostras utilizadas**

As amostras foram colhidas em seis estabelecimentos (A, B, C, D, E e F), sendo cinco hipermercados e uma peixaria, situados no município de Ribeirão Preto/SP. Os principais quesitos para essa seleção foram a fabricação de gelo com maquinário próprio e sua utilização na comercialização de pescados resfriados expostos em bancas de gelo no local. Adicionalmente, a peixaria era a principal fornecedora para as demais peixarias do município.

No período de novembro de 2009 a outubro de 2010, quinzenalmente, colhia-se uma amostra de gelo de aproximadamente 500g de cada estabelecimento, obtida por meio de funcionários que retiravam a amostra direto da máquina, antes do produto entrar em contato com o pescado. Foram colhidas 63 amostras, sendo 11 dos estabelecimentos A, B, C e D, 10 do estabelecimento E e nove do estabelecimento F e essas diferenças devem-se à ausência de gelo em alguns locais em determinados dias de colheita. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos limpos oferecidos pelos próprios estabelecimentos, com exceção da peixaria que as colocava em sacos plásticos esterilizados, sendo então transportadas em caixas de material isotérmico para o Laboratório de Análises de Alimentos de Origem Animal e Água do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/Unesp, onde inicialmente foram determinados o pH e o teor de cloro das mesmas e prosseguiu-se com as análises microbiológicas.

Para isso, houve o degelo de maneira asséptica, retirando as amostras dos sacos plásticos e transferindo para vidros esterilizados com capacidade de 500 mL. Sendo assim, os resultados estão expressos em mililitro (mL) de água de degelo.

## **4.2. Metodologia empregada**

### **4.2.1. Preparo das diluições das amostras**

Primeiramente foram preparadas as diluições das amostras, tomando 25 mL de cada uma delas e transferindo para um frasco tipo Erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada 0,1% esterilizada (diluição  $10^{-1}$ ). A partir desta diluição foram preparadas diluições decimais até  $10^{-3}$ , transferindo-se 10 mL de cada diluição anterior para frascos contendo 90 mL do mesmo diluente.

### **4.2.2. Contagem padrão em placas de microrganismos heterotróficos aeróbios ou facultativos, mesófilos e psicrotróficos viáveis (APHA, 2001).**

Para a determinação de microrganismos mesófilos e psicrotróficos 1 mL do gelo fundido e 1 mL de cada diluição foram depositados, em quadruplicata, no fundo de placas de Petri esterilizadas. Em seguida, foram adicionados de 15 a 20 mL de ágar padrão para contagem (APPC) fundido e resfriado a temperatura em torno de 45°C. Após a homogeneização e solidificação do ágar em temperatura ambiente, um conjunto de placas em duplicata foi incubado a 37°C por 24 a 48 horas para a quantificação de mesófilos e o outro a 7°C por 10 dias para a de psicrotróficos.

As contagens foram realizadas em contador de colônias, segundo técnica padrão, preferencialmente em placas com 25 a 250 unidades formadoras de colônias (UFC). A média do número das UFC contadas nas placas em duplicata, multiplicado pelo fator de diluição das placas correspondentes forneceu o número de microrganismos heterotróficos mesófilos e psicrotróficos por mililitro da amostra.

#### **4.2.3. Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais/mL (APHA, 2001)**

No teste presuntivo, a partir da amostra de gelo fundido ( $10^0$ ) e das diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  foram inoculados com 1 mL, respectivamente, três tubos de caldo lauril sulfato triptose com tubo de Durham invertido. Após a inoculação estes tubos foram incubados a  $37^\circ\text{C}$  por 24 a 48 horas e considerados positivos aqueles que apresentaram multiplicação bacteriana caracterizado por turvação do meio e produção de gás.

No teste confirmativo, a partir de cada tubo positivo no teste presuntivo foi transferida, com alça de níquel-cromo de 3 mm de diâmetro, uma alçada da cultura para tubos correspondentes contendo caldo lactose-verde brilhante-bile a 2% com tubo de Durham invertido. A incubação foi realizada a  $37^\circ\text{C}$  por 24 a 48 horas e considerados positivos os tubos que revelaram a presença de multiplicação bacteriana e produção de gás.

Para efeito de interpretação dos resultados, dentro das quatro séries inoculadas inicialmente, foram consideradas três séries consecutivas, a partir da maior diluição que ainda apresentasse os três tubos positivos. De acordo com o número de tubos positivos e, empregando a tabela de Hoskins, foi determinado o NMP de coliformes totais por mL.

#### **4.2.4. Determinação do NMP de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*/mL (ICMSF, 2000; APHA, 2001)**

Para coliformes termotolerantes, a partir de cada tubo de caldo lauril sulfato triptose com resultado positivo no teste presuntivo, foram inoculados, com uma alça, tubos correspondentes contendo caldo EC e tubo de Durham invertido. A incubação foi realizada em banho-maria a  $45,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas e considerados positivos os tubos que se revelaram com multiplicação bacteriana e presença de gás. Os resultados foram obtidos por comparação dos números de tubos positivos com os dados da tabela

de Hoskins, sempre considerando três diluições consecutivas a partir da maior diluição com três tubos positivos.

A determinação de coliformes termotolerantes sempre foi realizada com controle positivo e negativo, utilizando-se cepas conhecidas de *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*, respectivamente.

A partir dos tubos com caldo EC que apresentaram resultados positivos para coliformes termotolerantes, foram semeadas placas de ágar eosina-azul de metileno (EAM) que, em seguida, foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após a incubação, de cada placa foi realizado o isolamento de uma colônia que se revelasse, preferencialmente, de cor negra, achatada, seca e com brilho metálico, a qual foi semeada em ágar nutriente inclinado. Na ausência da colônia típica, foi isolada uma colônia clara com centro escuro.

Com o crescimento em ágar simples, obtido após incubação a 37°C por 24 horas, foram preparados esfregaços corados pelo método de Gram, para verificação da morfologia bacteriana. Uma vez constatada a presença de bacilos Gram negativos, em cultura pura, estes foram semeados em meios para a identificação bioquímica através das provas do IMViC: produção de Indol (I), do vermelho de metila (VM), de Voges-Proskauer (VP) e do aproveitamento de citrato (C).

#### **4.2.5. Contagem de *Staphylococcus sp.* e *aureus* (ICMSF, 2000; APHA, 2001)**

A partir da amostra de gelo fundido (10<sup>0</sup>) e das diluições 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-2</sup> foram retirados 0,2 mL e depositados em placas com ágar Baird-Parker, em duplicata e, a seguir, empregando-se um bastão de vidro esterilizado, em forma de “L”, foi procedida distribuição do inóculo por toda a superfície do meio. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas.

Após a incubação, foram contadas, preferencialmente, nas placas contendo 20 a 200 UFC, separadamente, as colônias negras, brilhantes, com zona de precipitação ao redor e circundadas ou não por halo claro e aquelas que se apresentaram somente negras e brilhantes.

Em sequência, três a cinco colônias de cada tipo foram semeadas em tubos com ágar nutriente inclinado e estes incubados a 37°C por 24 horas. Após a incubação foram preparados esfregaços corados pelo método de Gram e as culturas que se apresentavam em forma de cocos Gram positivos agrupados em forma de cachos de uva foram submetidas à prova da coagulase. Para a confirmação da espécie *Staphylococcus aureus*, as culturas coagulase positivas foram submetidas às provas da fermentação do manitol em anaerobiose e Voges–Proskauer (acetoína). Estas provas foram realizadas seguindo metodologia descrita em MacFADDIN (1976).

#### **4.2.6. Isolamento de bactérias do gênero *Salmonella* (ICMSF, 2000; APHA, 2001)**

Na fase de pré-enriquecimento, 25 mL de cada amostra foi transferida para frascos tipo Erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada a 1% tamponada. Após a homogeneização, o conjunto permaneceu em repouso por seis horas a temperatura ambiente. A seguir, procedeu-se a incubação a 37°C por 18 horas.

No enriquecimento seletivo, duas alíquotas de 1 mL cada, da cultura de pré-enriquecimento, foram inoculadas, respectivamente, em 10 mL de caldo selenito cistina e em 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis, adicionados de 0,1 mL de uma solução de novobiocina a 0,4%, originando uma concentração de 40µg do princípio ativo por mililitro do meio (PESSOA & PEIXOTO, 1971). Em seguida, os caldos seletivos foram incubados a 37°C por 24 horas.

Para o plaqueamento seletivo com auxílio de alça de níquel-cromo, cada cultura em caldo de enriquecimento foi semeada, pela técnica de esgotamento, em ágar verde-brilhante e ágar MacConkey, seguido de incubação a 37°C por 24 horas.

Na identificação presuntiva das culturas obtidas no plaqueamento seletivo foram tomadas, com auxílio de uma agulha de níquel-cromo, previamente flambada, de cada uma das placas semeadas, colônias com características sugestivas do gênero *Salmonella* e inoculadas em tubos contendo meio tríplice açúcar ferro e ágar lisina - descarboxilase para a realização da prova da descarboxilação da lisina. Confirmando-

se a suspeita do gênero, o crescimento seria repicado em ágar triptose inclinado, para posterior comprovação sorológica.

Para a confirmação sorológica do gênero, caso houvesse o aparecimento de culturas características, seria realizada através de testes sorológicos com soros polivalentes anti-salmonela somáticos e flagelares.

#### **4.2.7. Determinação da concentração de cloro residual livre e do pH (HANNA, 1997).**

Para determinação da concentração de cloro residual livre nas amostras de degelo foi utilizado o reagente NN Dietil Parafenileno Diamino (DPD) e colorímetro eletrônico (HI93710C-HANNA INSTRUMENTS). Inicialmente o aparelho foi zerado com 10 mL da amostra de água (gelo fundido) sem o reagente DPD. O resultado, que é dado em mg por litro, foi obtido após adição do reagente na cubeta com os 10 mL da amostra e homogeneização da mistura. Para determinação do pH foi utilizado um peagâmetro da marca ANALION.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nas Tabelas 2 e 3 referem-se às contagens padrão em placas de microrganismos heterotróficos mesófilos e psicotróficos, respectivamente.

Verifica-se pelos resultados apresentados na Tabela 2 que as populações de microrganismos mesófilos variaram de  $<1,0$  a  $3,0 \times 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> de água de degelo. Em 24 (38,10%) amostras os resultados foram  $<1$  UFC.mL<sup>-1</sup>, indicando que ocorreu ausência de microrganismos mesófilos. Por outro lado, em 39 (61,90%) amostras foram encontrados microrganismos com populações com até  $3,0 \times 10^4$  UFC. mL<sup>-1</sup>, ou seja, das amostras que foram encontrados microrganismos mesófilos, 12 (19,05%) apresentaram populações acima do permitido pela legislação vigente que estabelece como máximo  $5,0 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup> (BRASIL, 2004).

**TABELA 2.** Distribuição das amostras de gelo utilizado na conservação de pescado, colhidas durante o período de novembro/2009 a outubro/2010, segundo as populações de microrganismos heterotróficos mesófilos.

População de microrganismos heterotróficos mesófilos (UFC.mL <sup>-1</sup> )*	N. de amostras (%)
< 1,0	24 (38,10)
1,0 --- 1,0 x 10	6 (9,52)
1,0 x 10 --- 1,0 x 10 <sup>2</sup>	11 (17,46)
1,0 x 10 <sup>2</sup> --- 5,0 x 10 <sup>2</sup>	10 (15,87)
5,0 x 10 <sup>2</sup> --- 1,0 x 10 <sup>3</sup>	**5 (7,94)
1,0 x 10 <sup>3</sup> --- 5,0 x 10 <sup>3</sup>	**1 (1,59)
5,0 x 10 <sup>3</sup> --- 1,0 x 10 <sup>4</sup>	**3 (4,76)
1,0 x 10 <sup>4</sup> --- 3,0 x 10 <sup>4</sup>	**3 (4,76)
<b>Total</b>	<b>63 (100,00)</b>

\*Unidade formadora de colônia por mililitro

\*\* Amostras fora do padrão segundo a Portaria 518/2004 (BRASIL, 2004).

PIMENTEL & PANETTA (2003) analisaram 80 amostras de gelo para conservação de pescado no município de São Paulo e encontraram populações de microrganismos heterotróficos que variaram de  $3,0 \times 10^3$  a  $8,4 \times 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>, LATEEF et al. (2006) na Nigéria, avaliando 40 amostras, verificaram que todas estavam com valores de microrganismos heterotróficos mesófilos na proporção de  $2,9 \times 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Além disso, GIAMPIETRO & REZENDE-LAGO (2009) analisaram 30 amostras em Ribeirão Preto/SP e todas apresentaram populações de mesófilos acima de  $10^4$  chegando até  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> e VIEIRA et al. (1997), em 30 amostras colhidas de supermercados de Fortaleza/CE, observaram 13 (43,3%) com populações acima do permitido pela legislação. Todos esses resultados citados encontram-se acima dos verificados neste estudo, sendo que os autores chegaram à conclusão que as práticas inadequadas de higiene durante ou mesmo após a fabricação de gelo e a má qualidade da água levam à má qualidade desse produto.

Foram encontradas 12 (19%) amostras com populações acima do permitido pela Portaria nº518/2004/MS. Considerando que a principal função do gelo é a de conservar os alimentos e não permitir que ocorra multiplicação microbiana, os resultados obtidos demonstraram que além de não proteger o referido alimento, o mesmo pode ser um veículo de contaminação para o pescado e contribuir para diminuição da vida de prateleira.

Os manipuladores de alimentos, bem como o manuseio ou acondicionamento incorreto do gelo, estão entre os principais responsáveis pela sua contaminação devido à falta de orientação quanto às boas práticas de fabricação. As preocupações de segurança alimentar estão, portanto, relacionadas principalmente ao consumo de peixes crus ou mal-cozidos, pois esses podem veicular agentes de toxinfecções alimentares causando sérios riscos ao consumidor.

Os resultados apresentados na Tabela 3 referem-se às populações de microrganismos heterotróficos psicotróficos que variaram de  $<1,0$  a  $1,0 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> de água de degelo, sendo que 17 (26,98%) das amostras foram  $<1,0$  UFC.mL<sup>-1</sup>, comprovando a ausência de microrganismos psicotróficos. Já em 46 (73,01%) das

amostras os resultados obtidos foram de populações que variaram de 1,0 a  $1,0 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

**TABELA 3.** Distribuição das amostras de gelo utilizado na conservação de pescado, colhidas durante o período de novembro/2009 a outubro/2010, segundo as populações de microrganismos heterotróficos psicotróficos.

<b>População de microrganismos heterotróficos psicotróficos (UFC.mL<sup>-1</sup>)*</b>	<b>N. de amostras (%)</b>
< 1,0	17 (26,98)
1,0 l---l 1,0 x 10	8 (12,70)
1,0 x 10 ---l 1,0 x 10 <sup>2</sup>	8 (12,70)
1,0 x 10 <sup>2</sup> ---l 5,0 x 10 <sup>2</sup>	8 (12,70)
5,0 x 10 <sup>2</sup> ---l 1,0 x 10 <sup>3</sup>	1 (1,59)
1,0 x 10 <sup>3</sup> ---l 1,0 x 10 <sup>4</sup>	7 (11,11)
1,0 x 10 <sup>4</sup> ---l 1,0 x 10 <sup>5</sup>	6 (9,52)
1,0 x 10 <sup>5</sup> ---l 5,0 x 10 <sup>5</sup>	7 (11,11)
5,0 x 10 <sup>5</sup> ---l 1,0 x 10 <sup>6</sup>	1 (1,59)
<b>Total</b>	<b>63 (100,00)</b>

\* Unidade formadora de colônia por mililitro

Os microrganismos heterotróficos psicotróficos possuem a capacidade de produzir enzimas deteriorantes e têm grande importância em microbiologia de alimentos, uma vez que podem se desenvolver em produtos conservados sob refrigeração, mesmo em temperaturas próximas a 0°C, no entanto, a Portaria nº518/2004/MS não especifica um valor máximo para esses microrganismos na água (BRASIL, 2004; JAY, 2005).

Em Ribeirão Preto/SP, GIAMPIETRO & REZENDE-LAGO (2009) observaram a presença de populações de psicotróficos acima de  $10^4$  até  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Esses valores encontram-se acima dos 73,01% relatados nesse estudo, no entanto, como a legislação não contempla o valor máximo permitido, pode estar havendo a adição de uma carga microbiana ao pescado que pode acelerar sua deterioração e consequentemente ocasionar riscos ao produto e ao consumidor.

Vale ressaltar ainda que temperaturas entre  $-0,5^{\circ}\text{C}$  e  $-2,0^{\circ}\text{C}$  são recomendadas para a conservação do pescado refrigerado e preconiza-se a proporção de uma parte de gelo para uma parte de pescado (1:1), o que nem sempre é observado no comércio varejista podendo aumentar as chances de contaminação do pescado pela água de degelo (BRASIL, 1997; GALVÃO, 2006).

Tendo em vista a importância da presença destes microrganismos na água, os resultados encontrados no presente estudo chamam a atenção das autoridades para uma possível revisão na legislação vigente e a inclusão de um limite máximo aceitável de microrganismos psicrótrópicos na água utilizada na produção de gelo.

A Tabela 4 apresenta os resultados da população de coliformes totais e coliformes termotolerantes (NMP/mL) e o número de amostras correspondentes.

**TABELA 4.** Distribuição das amostras de gelo utilizado na conservação de pescado, colhidas durante o período de novembro/2009 a outubro/2010, segundo as populações de coliformes totais e coliformes termotolerantes.

População (NMP.mL <sup>-1</sup> )*	N° de amostras (%)	
	Coliformes Totais	Coliformes Termotolerantes
Ausência	49 (77,78)	57 (90,48)
0,4	1 (1,59)	2 (3,17)
0,9	1 (1,59)	1 (1,59)
1,5	0	1 (1,59)
2,1	0	1 (1,59)
2,3	2 (3,17)	0
4,3	2 (3,17)	0
9,3	1 (1,59)	0
12,0	1 (1,59)	0
15,0	2 (3,17)	1 (1,59)
21,0	2 (3,17)	0
110,0	1 (1,59)	0
460,0	1 (1,59)	0
<b>Total</b>	<b>63 (100,00)</b>	<b>63 (100,00)</b>

\* NMP: Número mais provável por mililitro

Os dados da Tabela 4 mostram que as populações de coliformes variaram de 0,4 a 460,0 NMP.mL<sup>-1</sup> para o grupo dos totais e de 0,4 a 15,0 NMP.mL<sup>-1</sup> para os termotolerantes. A ausência foi observada na maioria das amostras, tanto para coliformes totais (49/ 77,78%) quanto para termotolerantes (57/ 90,48%). No entanto, 14 (22,22%) foram positivas para coliformes totais e seis (9,52%) para termotolerantes. De acordo com a Portaria nº518/2004/MS, a água utilizada para produção de gelo (água tratada no sistema de distribuição: reservatórios e redes) poderá apresentar apenas uma amostra mensalmente positiva para coliformes totais em 100 mL e ausência de *E. coli* ou coliformes termotolerantes (BRASIL, 2004).

No presente estudo, um único estabelecimento não atendeu o previsto na legislação citada tendo em vista ter apresentado mais de uma amostra positiva para coliformes totais por mês, totalizando nove positivas para este grupo e cinco para termotolerantes (Anexos 1 e 2). Este local utilizava, exclusivamente, poço artesiano como fonte de abastecimento de água. A *Escherichia coli* não foi confirmada em nenhuma das amostras, mas isso não isenta a responsabilidade do uso de água potável.

GIAMPIETRO & REZENDE-LAGO (2009) em seus estudos encontraram 29 (96,7%) amostras positivas para coliformes totais e 22 (73,3%) para termotolerantes e ressaltaram que o gelo não deve conter nenhuma substância que possa ser perigosa para a saúde, obedecendo ao padrão de água potável.

VIEIRA et al. (1997) obtiveram 19 (24,3%) amostras positivas para coliformes termotolerantes o que levou a suspeita de que água não clorada foi utilizada ou que houve contaminação do gelo após sua saída da fábrica.

Muito embora haja legislação específica sobre a potabilidade da água, a avaliação da qualidade microbiológica do gelo neste experimento permite concluir que água não potável é utilizada nos estabelecimentos, o que é um fator de risco para a saúde do consumidor uma vez que o gelo em contato com o pescado pode contaminá-lo.

A Tabela 5 apresenta os resultados da população de *Staphylococcus* sp. e *S. aureus* e o número de amostras correspondentes.

Verifica-se na Tabela 5 que em 25 (39,68%) amostras ocorreu a presença de *Staphylococcus* sp., com populações superiores a 10 UFC.mL<sup>-1</sup>, chegando a 10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Dessas amostras foi confirmada a presença de *Staphylococcus* coagulase positivo em três, originárias de dois estabelecimentos, sendo um deles a peixaria, que é fabricante e fornecedora de gelo para outros locais de venda de pescado.

**TABELA 5.** Distribuição das amostras de gelo utilizado na conservação de pescado, colhidas durante o período de novembro/2009 a outubro/2010, segundo as populações de *Staphylococcus* sp. e *S. aureus*

Nº de microrganismos (UFC.mL <sup>-1</sup> )*	N. de Amostras (%)	N. de amostras positivas para <i>S. aureus</i>
< 10	38 (60,32)	
10 <sup>1</sup>  ----10 <sup>2</sup>	12 (19,05)	1
10 <sup>2</sup>  ----10 <sup>3</sup>	11 (17,46)	2
10 <sup>3</sup>  ----10 <sup>4</sup>	2 (3,17)	0
<b>Total</b>	<b>63 (100,00)</b>	<b>3</b>

\* Unidade formadora de colônia por mililitro

Embora na legislação atual “Norma de Qualidade da Água para Consumo Humano” (BRASIL, 2004) o valor máximo permitido para *Staphylococcus* sp. não seja contemplado, há na literatura resultados superiores ao presente estudo, como observado por SERRANO & SOUSA (2006) que, na cidade de São Carlos/SP encontraram 71% das amostras de gelo provenientes de bares e restaurantes com a presença de *Staphylococcus* sp. e 28% dessas com *Staphylococcus aureus*. Já ALBUQUERQUE et al. (2006) isolaram 11 (33,7%) estirpes de *Staphylococcus aureus* em seis amostras utilizadas em feiras livres para conservação de pescado em Fortaleza/CE.

A pesquisa dessa bactéria é mais um determinante da qualidade higiênica desse produto indicando que não há adoção de boas práticas na manipulação e classificando as amostras dos dois estabelecimentos positivos para *S. aureus* como impróprias, pois podem causar malefícios aos consumidores por serem agentes causadores de intoxicações de origem alimentar.

Não foram isolados microrganismos do gênero *Salmonella* nas amostras estudadas, sendo assim, conclui-se que o gelo estava dentro dos padrões da RDC nº12/2001 (BRASIL, 2001) quanto à ausência para *Salmonella* spp., assim como FARIAS & FREITAS (2008) que também não a encontraram em seus estudos. Por outro lado, FALCÃO et al. (2002), em Araraquara/SP, isolaram uma amostra de *Salmonella* Enteritidis e afirmaram que o gelo pode ser um importante veículo de contaminação por enterobactérias patogênicas apresentando riscos ao consumidor, quando obtido a partir de água contaminada.

LOURENÇO et al. (2006) detectaram 20% das amostras com a presença de *Salmonella* spp. e ALMEIDA FILHO et al. (2002) confirmaram sua presença em cinco amostras (16,7%) de pescados comercializados em supermercados e submetidos à refrigeração (gelo), o que evidenciou as condições higiênicas e sanitárias insatisfatórias. MURATORI et al. (1994) também verificaram a presença de *Salmonella* em 6,6% dos peixes analisados, caracterizando-os como potencialmente capazes de causar toxinfecção alimentar, por estarem expostos à venda sem refrigeração.

A Tabela 6 refere-se aos resultados médios dos teores de cloro residual livre e valores de pH encontrados no gelo dos diferentes estabelecimentos.

**TABELA 6.** Resultados médios dos teores de cloro e valores de pH em amostras de gelo adquiridas durante o período de novembro/2009 a outubro/2010.

<b>Estabelecimento</b>	<b>Cloro (ppm)*</b>	<b>pH</b>
A	0,30	7,44
B	0,39	8,02
C	0,34	8,10
D	0,79	8,09
E	0,44	7,21
F	0,39	7,40

\* parte por milhão

PIMENTEL & PANETTA (2003) observaram pH entre 4,88 e 6,98 em sua pesquisa, resultados que podem favorecer a multiplicação bacteriana no gelo.

GIAMPIETRO & REZENDE-LAGO (2009) relataram 29 (96,6%) amostras em desacordo quanto ao teor de cloro residual e 12 (40%) em desacordo com a legislação referente ao pH, esses resultados indicaram que há riscos ao produto armazenado, bem como à população consumidora.

De acordo com os resultados expostos, todos os estabelecimentos estavam dentro do previsto pela Portaria nº 518/2004/MS, porém especial atenção deve ser dada ao estabelecimento B (Anexos 1 e 2) que, apesar de apresentar valores dentro dos padrões normais para os parâmetros analisados, confirmou a presença de coliformes termotolerantes o que leva a reconsiderar a quantidade de cloro utilizada, visto que não houve a total diminuição dos patógenos.

## 6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesse estudo sobre o gelo utilizado para conservação de pescado em seis estabelecimentos de Ribeirão Preto/SP pode-se concluir que:

- os microrganismos heterotróficos mesófilos foram encontrados em 61,90% das amostras, sendo que 19,05% delas estavam fora dos padrões estabelecidos pela legislação;
- os microrganismos psicrotróficos foram encontrados em 71,03% das amostras, muitas delas com populações elevadas, o que leva a considerar uma possível revisão na legislação vigente, incluindo um limite máximo aceitável para este grupo na água utilizada;
- a presença de coliformes totais e termotolerantes em 22,22% e 9,52% das amostras, respectivamente, reforça a importância da utilização de água potável, mesmo não encontrando *Escherichia coli* em nenhuma delas;
- a presença de *Staphylococcus aureus* em três amostras demonstra a importância do treinamento dos funcionários quanto às boas práticas de fabricação;
- muito embora não tenha sido verificada a presença de *Salmonella* spp. e os teores de cloro e pH apresentados com valores dentro da normalidade, os outros grupos microbianos encontrados caracterizam o gelo como possível veículo de contaminação para o pescado.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNESE, A.P.; OLIVEIRA, V.M.; SILVA, P.P.O.; OLIVEIRA, G.A. Contagem de bactérias heterotróficas aeróbicas mesófilas e enumeração de coliformes totais e fecais, em peixes frescos comercializados no município de Seropédica, RJ. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 88, p. 67-70, 2001.

ALBUQUERQUE, W. F.; VIEIRA, R. H. S. F.; VIEIRA, G.H.F. Isolamento de *Staphylococcus aureus* do gelo, água, bancadas e vendedores de pescado da feira de Mucuripe, Fortaleza, Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 37, n. 3, p. 299-303, 2006.

ALMEIDA FILHO E.S.; SIGARINI, C.O.S.; RIBEIRO, J.N.; DELMONDES, E.C.; STELATTO, E.; ARAUJO JÚNIOR, A. Características microbiológicas de “Pintado” (*Pseudoplatystoma fasciatum*) comercializado em supermercados e feiras livres no município de Cuiabá-MT. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 99, p. 84-88, 2002.

ALVARES, P. P.; MARTINS, L.; BORGHOFF, T.; SILVA, W. A.; ABREU, T. Q.; GONÇALVES, F. B. Análise das características higiênico-sanitárias e microbiológicas de pescado comercializado na grande São Paulo, **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 22, n. 161, p. 88-93, 2008.

ALVES, C. L.; CARVALHO, F. L. N.; GUERRA, C. G.; ARAUJO, W. M. C. Comercialização de pescado no Distrito Federal: avaliação das condições. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 102/103, p. 41-49, 2002.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Committee on microbiological methods for foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676p.

BARRETO, N. S. E. *Staphylococcus aureus* In: VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo: Varela, 2004. cap. 08 p. 95-103.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria SVS/MS n. 326 de 30 de julho de 1997. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 ago. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 04 jun. 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução – RDC n.12 de 2 de janeiro de 2001. Revoga Portaria n.451, de 19 de setembro de 1997. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jul.1998. Art. 4º, p.1-48. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 518 de 25 de março de 2004. Procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2008/2009**. Poder Executivo, Brasília, DF. Disponível em: [http://www.sepaq.pa.gov.br/files/u1/anuario\\_da\\_pesca\\_completo.pdf](http://www.sepaq.pa.gov.br/files/u1/anuario_da_pesca_completo.pdf)> Acesso em: 21 jan. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004, **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, Brasília, v.6, n.5, p.1-7, 2005.

CASTANIA, J., **Qualidade da água utilizada para consumo em escolas públicas municipais de ensino infantil em Ribeirão Preto/SP**. 2009. 146f. **Dissertação** (Mestrado em Enfermagem) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

CUNHA, M. L. R. S.; PERESI, E.; CALSOLARI, R. A. O.; ARAÚJO JUNIOR, J. P. Detection of enterotoxins genes in coagulase – negative *Staphylococci* isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 70-74, 2006.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n.3, p.263-271, 2002.

DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H. **Manejo Sanitário Animal**. Rio de Janeiro: EPUB, 2001. p. 03-05.

EVANGELISTA – BARRETO, N. S.; VIEIRA, R. H. S. F. Investigação sobre possíveis portadores de *Staphylococcus aureus* em duas indústrias de pesca. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 104/105, p. 49-57, 2003.

FALCÃO, J. P.; DIAS, A. M. G.; CORREA, E. F.; FALCÃO, D. P. Microbiological quality of ice used to refrigerate foods. **Food Microbiology**, London, v. 19, p. 269-276, 2002.

FALCÃO, J. P.; FALCÃO, D. P.; GOMES, T. A. T. Ice as a vehicle for diarrheagenic *E. coli*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 91, p. 99-103, 2004.

FARIAS, M. C. A.; FREITAS, J. A. Qualidade microbiológica de pescado beneficiado em indústrias paranaenses. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 113-117, 2008.

FEHD – FOOD AND ENVIRONMENTAL HYGIENE DEPARTMENT. **The microbiological quality of edible ice from ice manufacturing plants and retail businesses in Hong Kong**. 2005. p. 01-24. Disponível em:

<[http://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme\\_rafs/files/edible\\_ice\\_ra.pdf](http://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme_rafs/files/edible_ice_ra.pdf)>.

Acesso em: 05 jan. 2011.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 155-168.

FORTUNA, J. L.; FRANCO, R. M. Pequeno dossiê epidemiológico da *Salmonella*, como causadora de infecções alimentares. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 128. p. 33-43. 2005.

FSAI – FOOD SAFETY AUTHORITY OF IRELAND. First quarter national microbiological survey. **Microbiological quality of ice for cooling drinks**. 2002. p. 01-19. Disponível em: <[http://www.fsai.ie/uploadedFiles/ice\\_cooling\\_drinks.pdf](http://www.fsai.ie/uploadedFiles/ice_cooling_drinks.pdf)>. Acesso em: 12 jan. 2011.

GALVÃO, J. A. Boas práticas de fabricação: da despesca ao beneficiamento. In: SIMCOPE, 2., 2006, São Vicente. Disponível em: <<http://www.pesca.sp.gov.br/iisimcope/palestras.htm>>. Acesso em: 06 abr. 2009.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. p 204-208.

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

HANNA INSTRUMENTS. **Ion specific meters**. Lisboa, 1997.

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

ICMSF – INTERNATIONAL COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOOD. **Microorganisms in food. I** – their significance and methods of enumeration. 2nd. ed. Toronto: University Press, 2000. 439p.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 347-361.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN J. W. C. **Diagnóstico microbiológico**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi. 2008. p. 618-656.

KUMAR, H. S.; PARVATHI, A.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Prevalence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* in tropical seafood. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 21. p. 619-623, 2005.

LAGAGGIO, V. R. A.; FLORES, M. L.; SEGABINAZI, S. D. Avaliação microbiológica da superfície do restaurante universitário, da :Universidade Federal de Santa Maria, RS. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 100, p. 107-110, 2002.

LAMAITA, H.C. **Freqüência de espécies de Staphylococcus, de TSST-1 e de enterotoxinas estafilocócicas em leite cru refrigerado em propriedades de Minas Gerais**. 2003. 74f. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

LATEEF, A.; OLOKE, J. K.; KANA, E. B. G.; PACHECO, E. The microbiological quality of ice used to cool drinks and foods in Ogbomoso Metropoles, Southwest, Nigeria. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 8, p. 39-43, 2006.

LOURENÇO, L. F. H.; OLIVEIRA, M.L.; PINTO, C. M. C.; PEREIRA, D. X. P. Análises físico-químicas de caranguejo-uça *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), comercializada nos municípios de São Caetano de Odivelas e Belém, PA. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 142, p. 90-95, 2006.

MacFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore. The Williams e Wikins, 1976. 312p.

MEYER, S. T. O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.10 n.1. p. 99-110, 1994.

MURATORI, M. C. S.; PEREIRA, M. M. G.; SOARES, L.R. Pesquisa de bactérias potencialmente patogênicas em pescado comercializado no mercado central de Teresina – PI. **Boletim. CEPPA**, Curitiba, n. 1. p. 33-38. 1994.

MURATORI, M. C. S.; COUTO FILHO, C. C. C.; ARARIPE, M. N. B. A.; LOPES, J. B; COSTA, A. P. R. *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em manipuladores de piscicultura. **Revista Científica de Produção Animal**, Teresina, v. 09, n.2, p. 120-126, 2007.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual de Pesca**. ciência e tecnologia do pescado. São Paulo: Varela, p. 3-5, 1999.

PESSOA, G.V.A.; PEIXOTO, E. S. Caldo-selenito novobiocina. Um meio de maior seletividade para isolamento de *Salmonella* de fezes. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 31, p. 1-3, 1971.

PIMENTEL, L. P. S., PANETTA, J. C. Condições higiênicas do gelo utilizado na conservação de pescado comercializado em supermercados na Grande São Paulo. Parte 1, resultados microbiológicos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 106, p. 56-63, 2003.

PIMENTEL, L. P. S.; PANETTA, J. C. Condições higiênicas do gelo utilizado na conservação de pescado comercializado em supermercados na Grande São Paulo. Parte 2, resultados físico – químicos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 106, p. 64-71, 2003.

QUINN, P. J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD F.C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 55-59.

RODRIGUES NETO, A. A. R.; VASCONCELOS, U.; ALMEIDA, F.R.; CALAZANS, G.M.T. Avaliação bacteriológica do gelo em pacote comercializado em Recife – PE. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 23, n. 168/169, p. 172-175, 2009.

SCHERER, R.; DANIEL, A. P.; AUGUSTI, P. R.; LAZZARI, R.; LIMA, R. L.; FRIES, L. L. M.; RADUNZ NETO, J.; EMANUELLI, T. Efeito do gelo clorado sobre parâmetros químicos e microbiológicos da carne de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*). **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 680-684, 2004.

SERRANO, N. F. G.; SOUSA, C. P. Incidência de coliformes, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* coagulase positivo e *Salmonella* spp. em gelo produzido e comercializado na cidade de São Carlos. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO

CIENTÍFICA DA UFSCar, 14., 2006, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFScar, 2006. v. 14. p. 65-68.

SILVA, L. M.; SOUZA, E. H.; ARREBOLA, T. M.; JESUS, G. A. Ocorrência de um surto de hepatite A em 3 bairros do município de Vitória (ES) e sua relação com a qualidade de água de consumo humano. **Revista Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 6, p. 2163-2167, 2009.

VIEIRA, R. H. S. F., SOUZA, O. V., PATEL, T. R. Bacteriological quality of ice used in Mucuripe Market, Fortaleza, Brasil. **Food Control**, Guildford, v. 8, n. 2, p. 83-85, 1997.

VIEIRA, R. H. S. F.; SAKER-SAMPAIO, S. Emprego de gelo nos barcos. In: VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo: Varela, 2004. cap. 02. p. 37-39.

WHO World Health Organization. **Water, sanitation and hygiene links to health**. 2004. Disponível em:

<[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/facts2004/en/index.html](http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/facts2004/en/index.html)>.

Acesso em: 05 fev. 2011.

WHO World Health Organization. **Water, sanitation and hygiene links to health**.

2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>>.

Acesso em: 05 fev. 2011.

## 8. ANEXO 1

População Coliformes Termotolerantes (NMP.mL <sup>-1</sup> )*	Amostras						Total
	A	B	C	D	E	F	
< 0,3	11	6	10	11	10	9	57
0,4	0	2	0	0	0	0	2
0,9	0	0	1	0	0	0	1
1,5	0	1	0	0	0	0	1
2,1	0	1	0	0	0	0	1
2,3	0	0	0	0	0	0	0
4,3	0	0	0	0	0	0	0
9,3	0	0	0	0	0	0	0
12,0	0	0	0	0	0	0	0
15,0	0	1	0	0	0	0	1
21,0	0	0	0	0	0	0	0
110,0	0	0	0	0	0	0	0
460,0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>63</b>

\* Número mais provável por mililitro

## 9. ANEXO 2

População Coliformes Totais (NMP.mL <sup>-1</sup> )*	Amostras						Total
	A	B	C	D	E	F	
< 0,3	10	2	8	11	9	9	49
0,4	1	0	0	0	0	0	1
0,9	0	0	1	0	0	0	1
1,5	0	0	0	0	0	0	0
2,1	0	0	0	0	0	0	0
2,3	0	1	1	0	0	0	2
4,3	0	1	1	0	0	0	2
9,3	0	0	0	0	1	0	1
12	0	1	0	0	0	0	1
15	0	2	0	0	0	0	2
21	0	2	0	0	0	0	2
110	0	1	0	0	0	0	1
460	0	1	0	0	0	0	1
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>63</b>

\* Número mais provável por mililitro