

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE SUSHIS
ADQUIRIDOS EM ESTABELECIMENTOS QUE
COMERCIALIZAM COMIDA JAPONESA.**

Rafael Akira Sato

Médico Veterinário

JABOTICABAL – São Paulo – Brasil

Julho de 2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE SUSHIS
ADQUIRIDOS EM ESTABELECIMENTOS QUE
COMERCIALIZAM COMIDA JAPONESA.**

Rafael Akira Sato

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 a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária – Área de Concentração Medicina Veterinária Preventiva.

JABOTICABAL – São Paulo – Brasil

Julho de 2013

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAFAEL AKIRA SATO – Nasceu na cidade Rio Verde do Mato Grosso – MS, em 28 de junho de 1982. Médico Veterinário formando pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal – SP, em 29 de novembro de 2008. Durante a graduação realizou estágios em diversas áreas da Medicina Veterinária. Após o término do Curso de Graduação atuou como Médico Veterinário autônomo na área de Clínica e Anestesiologia. Em junho de 2010 começou a acompanhar algumas atividades de pós-graduandos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, onde auxiliou e adquiriu conhecimento sobre a área. Em 14 de março de 2011 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, UNESP, sob orientação do Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior.

DEDICATÓRIA

A Nossa Senhora por iluminar e proteger o meu caminho.

Aos meus pais José Takashi Sato e Tereza Shizuko Kubota Sato, pelo amor, amizade, apoio e dedicação. Aos meus irmãos Vanessa e Leonardo, pela amizade, brincadeiras e alegrias.

Obrigado a vocês, que fazem parte da minha vida, influenciando positivamente na minha personalidade, ética e formação como ser humano.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Oswaldo Durival Rossi Júnior pela confiança, amizade e orientação na elaboração deste trabalho, compartilhando seus conhecimentos e contribuindo para minha formação ética e profissional.

A FAPESP, por conceder a bolsa de estudo juntamente com auxílio técnico possibilitando a minha manutenção pessoal durante o mestrado, bem como disponibilizando recursos para execução do projeto.

Aos técnicos do laboratório, Liliana Biondi Naka (Lila) e Waldemar Dibelli Júnior (Diba), amigos e companheiros de trabalho que tanto ajudaram na execução deste projeto.

Aos amigos Roberto Barbuio (So-dá), Patrícia Martins Évora (Patolina), Eduardo Nakaghi, Alan Mansano, Rafael Sartori e companheiros da República Filomena pela amizade, alegria e momentos de descontração.

SUMÁRIO

Assunto

Página

RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iii
ÍNDICE DE TABELAS	iv
1. INTRODUÇÃO	1
3. REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1. História do Sushi	3
3.2. Microrganismos indicadores aeróbios heterotróficos mesófilos e psicrotróficos.....	5
3.3. Coliformes e <i>Escherichia coli</i>	7
3.4. <i>Salmonella</i> spp.....	8
3.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	10
3.6. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Colheita, acondicionamento e transporte das amostras	13
4.2. Metodologia empregada	14
4.3. Análise Estatística	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
6. CONCLUSÕES	38
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
8. REFERÊNCIAS.....	39

Características microbiológicas de sushis adquiridos em estabelecimentos que comercializam comida japonesa.

RESUMO – O controle de qualidade dos alimentos refere-se a toda e qualquer ação que visa melhorar as boas práticas nos procedimentos de higiene e manipulação de alimentos. Portanto, existe a necessidade contínua de obter dados, estudar e fiscalizar a produção e comercialização no setor alimentício, produzindo assim um “alimento seguro”, livre de qualquer contaminação capaz de causar danos à saúde dos consumidores. Diante dessa necessidade, esse trabalho avaliou a qualidade microbiológica de sushis adquiridos em 15 restaurantes especializados em comida japonesa e 15 restaurantes não especializados da região de Ribeirão Preto - SP. As populações de microrganismos heterotróficos mesófilos e psicotróficos variaram de $3,9 \times 10^2$ a $1,7 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ e $7,5 \times 10^2$ a $1,4 \times 10^9$ UFC.g⁻¹, respectivamente. Todas as amostras analisadas apresentaram *Staphylococcus* sp., com populações variando de $2,0 \times 10^2$ a $3,8 \times 10^5$ UFC.g⁻¹, sendo que 23,3% foram caracterizados como *Staphylococcus* coagulase positivo e 13,3% apresentaram valores de populações acima do limite estabelecido. Foram encontrados coliformes totais e termotolerantes em 83,3% e 60,0% das amostras, respectivamente, e 33,3% das mesmas estavam acima do limite estabelecido para coliformes termotolerantes. As presenças de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram identificadas em 16,7% e 30,0% das amostras, respectivamente. *Salmonella* sp. e *Vibrio parahaemolyticus* não foram isoladas nesse trabalho. Não houve diferença na qualidade microbiológica de sushis oferecidos pelos dois tipos de estabelecimentos.

Palavras-chaves: *Escherichia coli*, microbiologia, salmão, *Staphylococcus aureus*, sushi

Microbiological characteristics of sushi acquired in establishments that sell Japanese food.

ABSTRACT - Food quality control refers to all and any action aimed at improving good practice in hygiene procedures and food handling. Therefore, there is a continuous need to obtain data, study and monitor the production and marketing in the food industry, thus producing a "safe food", free from any contamination that may cause damage to the consumers' health. Given this need, this study evaluated the microbiological quality of sushi bought in 15 restaurants specialized in Japanese food and 15 non-specialized restaurants from the region of Ribeirão Preto - SP. The populations of heterotrophic mesophiles and psychrotrophic microorganisms ranged from 3.9×10^2 to 1.7×10^7 UFC.g⁻¹ and 7.5×10^2 to 1.4×10^9 UFC.g⁻¹, respectively. All samples presented *Staphylococcus* sp., with populations ranging from 2.0×10^2 to 3.8×10^5 UFC g⁻¹, where 23.3% were classified as positive coagulase *Staphylococcus* and 13.3% had population values above the established limit. Total and thermotolerant coliforms were found in 83.3% and 60.0% of the samples, respectively, and 33.3% of them were above the established thermotolerant coliform limit. The presence of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were identified in 16.7% and 30.0% of the samples, respectively. *Salmonella* sp. and *Vibrio parahaemolyticus* were not isolated in this research. There was no difference in the microbiological quality of sushi offered by the two types of establishments.

Keywords: *Escherichia coli*, microbiology, salmon, *Staphylococcus aureus*, sushi

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela

Página

1. População de microrganismos heterotróficos mesófilos em cada uma das amostras de sushi *in natura* coletadas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa, com as médias aritméticas e desvio padrão dos resultados obtidos. (Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto – SP, 2011 e 2012)..... 20
2. Distribuição das amostras de sushi *in natura*, coletadas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa, segundo o exponencial de microrganismos heterotróficos mesófilos. (Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto – SP, 2011 e 2012)..... 21
3. População de microrganismos heterotróficos psicrotróficos em cada uma das amostras de sushi *in natura*, coletadas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa, com as médias aritméticas e desvio padrão dos resultados obtidos. (Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto – SP, 2011 e 2012)..... 23
4. Distribuição das amostras de sushi *in natura*, coletadas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa, segundo o exponencial de microrganismos heterotróficos psicrotróficos. (Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto – SP, 2011 e 2012)..... 24

5. População de *Staphylococcus* sp. em cada uma das amostras de sushi *in natura* coletadas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa, com as médias aritméticas e desvio padrão dos resultados obtidos. (Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto – SP, 2011 e 2012)..... 26
6. Distribuição das amostras de sushi *in natura* coletadas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa, segundo o exponencial das populações de *Staphylococcus* sp. (Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto – SP, 2011 e 2012)..... 27
7. Populações de estafilococos coagulase positivo nas amostras de sushi *in natura*, distribuídos segundo o tipo de estabelecimentos em que foram adquiridos e as amostras em que foi confirmada a presença de *Staphylococcus aureus*. (Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto – SP, 2011 e 2012)..... 28
8. Populações de coliformes totais e coliformes termotolerantes (NMP.g⁻¹) em cada uma das amostras de sushi *in natura*, coletadas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa e médias aritméticas dos resultados obtidos. (Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto – SP, 2011 e 2012)..... 30
9. Distribuição das amostras de sushi *in natura* coletadas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa, segundo o exponencial de coliformes totais (NMP.g⁻¹). (Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto – SP, 2011 e 2012)..... 31
10. Distribuição das amostras de sushi *in natura* coletadas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa, segundo o exponencial de coliformes termotolerantes (NMP.g⁻¹). (Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto – SP, 2011 e 2012)..... 32

11. Distribuição das amostras em que foram quantificadas *Escherichia coli* e coliformes termotolerantes, segundo o tipo de estabelecimento comercial. (Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto – SP, 2011 e 2012)..... 33
12. Médias aritméticas e desvios padrão das populações de microrganismos heterotróficos mesófilos, heterotróficos psicrotóxicos, *Staphylococcus* sp., coliformes totais e coliformes termotolerantes, distribuídos pelo tipo de estabelecimentos onde as amostras foram coletadas. (Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto – SP, 2011 e 2012)..... 34
13. Amostras fora do padrão para estafilococos coagulase positivo e coliformes termotolerantes, segundo os parâmetros estabelecidos pela RDC - nº12, de 2 de janeiro de 2001 para alimentos similares, distribuídos pelo tipo de estabelecimento onde foram coletadas. (Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto – SP, 2011 e 2012)..... 37

1. INTRODUÇÃO

O setor gastronômico no Brasil apresenta uma vasta variedade culinária e é responsável por gerar muitos dos empregos diretos no país, o que representa milhões de pessoas.

Dentro dessa cadeia, os “sushi-bares”, “fast-foods” e restaurantes especializados em comida japonesa vêm ganhando destaque, devido ao crescimento no número de estabelecimentos que oferecem esse tipo de serviço. Tudo isso, devido à popularização da comida, que atualmente apresenta um “status” de saudável e nutritiva, conquistando novos adeptos.

A tradicional culinária japonesa é conhecida mundialmente pelo hábito de consumir peixe cru ou *in natura*. Ao viajar para qualquer país, certamente existirão restaurantes japoneses onde o sushi (prato que apresenta pescado cru como ingrediente) é uma das especialidades. Entretanto, o fato de apresentar um ingrediente cru faz com que algumas pessoas ainda sintam receio ou aversão a esse tipo de alimento. Mas do ponto de vista da saúde pública, o ingrediente *in natura* gera uma preocupação relacionada com doenças veiculadas por alimentos.

As doenças de origem alimentar ocorrem quando um indivíduo ingere alimentos contaminados com agentes infecciosos ou tóxicos que entram no organismo. Dentre os microrganismos potencialmente patogênicos que podem ser veiculados através do pescado cru, destacam-se *Aeromonas* sp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*.

Diante desse crescimento do consumo da comida japonesa, aliada aos riscos de contaminação do alimento durante a produção, estocagem e venda desses produtos surge a preocupação com a qualidade dos produtos vendidos nos estabelecimentos especializados e não especializados.

2. OBJETIVOS

Diante do exposto idealizou-se o presente estudo com os objetivos de:

- Avaliar as características microbiológicas dos sushis comercializados em restaurantes especializados em comida japonesa e em estabelecimentos comerciais não especializados, através da quantificação de microrganismos mesófilos, psicrotróficos, coliformes totais e termotolerantes;
- Avaliar o perigo de veiculação de agentes de enfermidades de origem alimentar pelo consumo de sushis, especialmente *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e comparar com parâmetros de qualidade pré-estabelecidos para pescado cru pela legislação vigente;
- Avaliar se existe diferença na qualidade microbiológica dos produtos comercializados em estabelecimentos especializados e não especializados;
- Contribuir com subsídios técnicos para a criação de uma legislação brasileira referente aos padrões microbiológicos específicos para a comida japonesa.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. História do Sushi

A origem do sushi está ligada à necessidade de conservação de peixe cru, por de métodos desenvolvidos pelos povos antigos do Sudeste da Ásia. Não existem registros precisos de quando começaram essas técnicas, mas sabe-se que no século V a.C. a conservação de peixe cru com arroz já era realizada (BARBER; TAKEMURA, 2008).

A técnica de conservação consistia na retirada da cabeça e vísceras do peixe, sendo depois seus filetes salgados e armazenados em barris de madeira com camadas de arroz cozido entre eles. O arroz cozido fermentava naturalmente, liberando ácido láctico, que diminuía o pH e garantia a conservação do peixe. Ao longo do processo de conservação (entre um a três anos) o arroz se tornava impróprio para o consumo, sendo descartado e somente o peixe aproveitado (PATROCINIO, 2009).

No início do século VII d.C., essa técnica foi introduzida no Japão e sofreu uma pequena modificação, onde os japoneses passaram utilizar pedras para prensar o peixe cru e o arroz (BARBER; TAKEMURA, 2008). Dessa forma, foi criado o *naresushi* (um tipo de sushi) que apresenta odor e sabor fortes como características. Um exemplo desse tipo de sushi é o *funasushi*, feito com carpa (YOSHINO, 1997).

No século XV, surge o *namanaresushi*. Parecido com o *naresushi*, o seu tempo de fermentação é menor (cerca de um mês), o que possibilitava o consumo do arroz junto com o peixe, sendo considerada a primeira forma de sushi moderno (YOSHINO, 1997).

Por volta do século XVII, em Edo (atual Tóquio), o médico Matsumoto Yoshiichi teve a idéia de introduzir o vinagre na preparação do arroz, o que reduziu o tempo de preparo do sushi para um dia. Sendo assim, com a abundância de pescado e frutos do mar na baía de Tóquio, o peixe passou a ser consumido cru e fresco. Além do ganho de tempo no preparo, o vinagre adicionou um sabor especial ao prato. Esse tipo de sushi é chamado de *hayasushi* (PATROCINIO, 2009).

Ainda no final do século XVII, na região de Osaka um novo tipo de sushi que ficou conhecido como “estilo Kansai” foi criado. Chamado de *oshisushi*, ele é preparado numa caixa de madeira, onde o arroz e o peixe cru são colocados com um peso por cima. O peso realiza uma compressão, modelando o sushi, que depois é cortado em pedaços retangulares (BARBER; TAKEMURA, 2008).

No início do século XIX, surge um “hábil chefe” chamando Hanaya Yohei (1799 – 1858) considerado o primeiro *sushiman* da história. Trabalhando em *yattai* (barraca) nas ruas de Tóquio passou a confeccionar um sushi que deixou de ser um método de conservação, tornando-se um alimento de consumo imediato. Assim surgiu o sushi mais parecido com o que se consome na atualidade, um bolinho de arroz de sushi com uma fatia de peixe cru, que é famoso e conhecido popularmente como *niguirisushi*. Como não havia refrigeradores, os peixes eram marinados em molho soja ou vinagre e o tamanho do bolinho era o dobro do atual (BARBER; TAKEMURA, 2008).

O prato se popularizou rapidamente no Japão em duas modalidades: “estilo de Kansai”, da cidade de Osaka (região de Kansai) e “estilo Edo”, da cidade de Tóquio. Em Osaka desenvolveu-se um sushi com arroz temperado com outros ingredientes, servido em uma embalagem comestível. Em Tóquio, devido a sua localização numa baía rica em frutos do mar e peixes, comercializava-se o *niguirisushi*. A partir da década de 1950, a comercialização do sushi passou a ser em estabelecimentos fixos com cadeiras e mesas para pessoas se sentarem (BARBER; TAKEMURA, 2008). Hoje no Brasil, segundo Scafuro (2012), na capital paulista existem cerca de 600 restaurantes especializados em comida japonesa, contra 500 churrascarias.

Atualmente o sushi é um nome genérico e representa uma grande variedade de alimentos que apresentam uma forma de bolinho (retangular, cilíndrica, triangular, etc.) contendo basicamente arroz temperado, algas e peixe cru. Tradicionalmente é feito com arroz temperado (vinagre, açúcar e sal), combinado com algum tipo de peixe, frutos do mar e vegetais, frutas ou até mesmo ovo. A tradição japonesa é de servi-lo acompanhado de wasabi (raiz forte japonesa) e shoyu (molho de soja).

Com o sucesso da comida japonesa e expansão sushi - bares e dos restaurantes especializados, novas variedades de sushis são criadas, aumentando o leque que engloba o termo “sushi”.

3.2. Microrganismos indicadores aeróbios heterotróficos mesófilos e psicrotrotócos

Segundo Franco e Landgraf (1996), microrganismos indicadores são, grupos ou espécies de microrganismos que quando presentes em um alimento podem fornecer informações sobre a provável presença de patógenos, além de indicar a ocorrência de contaminação fecal e servir de ferramenta para estimar o potencial de deterioração do alimento. Também é possível avaliar as condições sanitárias durante o processamento, produção e armazenamento do produto.

Como exemplos de microrganismos indicadores podem ser citados aqueles que, segundo o ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1981), agrupam-se em: microrganismos que não oferecem um risco direto à saúde, sendo eles heterotróficos mesófilos, heterotróficos psicrotrotócos, heterotróficos termófilos, bolores e leveduras; e microrganismos que oferecem um risco baixo ou indireto à saúde, como coliformes totais, coliformes fecais, enterococos, enterobactérias totais e *Escherichia coli*.

Não existe na legislação brasileira um limite definido sobre o número aceitável de microrganismos mesófilos, psicrotrotócos e coliformes totais.

A contagem de aeróbios heterotróficos mesófilos funciona como um indicador de qualidade de alimentos (REINBOLD, 1983). Encontrar a população elevada deste grupo de microrganismos em um alimento aumenta a probabilidade da existência de bactérias patogênicas, sendo que a maioria das bactérias patogênicas são mesófilas (CARVALHO, 1999). Jay (2005) relata que populações acima de 10^6 UFC.g⁻¹ podem ser responsáveis pelo desencadeamento de doenças de origem alimentar. A população deste tipo de bactérias inclui os microrganismos que se multiplicam em aerobiose e temperaturas de incubação entre 15 e 45°C, com uma temperatura média de 35°C (SILVA JUNIOR, 2001).

ICMSF (1981) estabelece que populações de aeróbios heterotróficos mesófilos não devem ser superiores a 10^6 UFC.g⁻¹ da amostra analisada. Gilbert et al. (2000) por outro lado apresentaram uma tabela de classificação para esses microrganismos, onde valores acima de 10^4 UFC.g⁻¹ são considerados inadequados em alimentos a base de peixes marinhos crus.

Em alimentos deteriorados, números elevados de microrganismos heterotróficos mesófilos são esperados, variando de acordo com o tipo de alimento e microrganismo presente. A maioria dos alimentos apresenta populações superiores a 10^6 UFC.g⁻¹ quando alterações são detectáveis. Entretanto, há aqueles em que são necessárias 10^7 ou até mesmo 10^8 UFC.g⁻¹. Os alimentos fermentados apresentam população microbiana de, aproximadamente, 10^8 UFC.g⁻¹ sem, no entanto, serem considerados deteriorados (CARVALHO, 1999).

Agnese et al. (2001), avaliaram peixes frescos comercializados no Município de Seropédica - RJ, relataram valores de mesófilos entre 3,56 a 5,85 Log₁₀ de UFC.g⁻¹.

Lira et al. (2001) ao estudarem a qualidade de peixes comercializados em Maceió - AL, observaram que 37 (82,0%) amostras apresentaram contagens de até 10^5 UFC.g⁻¹, enquanto que em 8 (17,8%) as populações eram de até 10^6 UFC.g⁻¹ para microrganismos mesófilos.

Santos et al. (2011), ao analisarem 24 amostras de temakis grelhados, verificaram que 87,5% das amostras analisadas apresentavam valores acima de 10^5 UFC.g⁻¹ para microrganismos mesófilos. Muratori et al. (2004), em Teresina - PI, identificaram populações elevadas de microrganismos heterotróficos mesófilos entre 10^5 e 10^6 UFC.g⁻¹ em 55,9% das amostras de pescado *in natura*.

A contagem total de microrganismos aeróbios psicotróficos avalia o grau de deterioração de alimentos refrigerados (REINBOLD, 1983). Dentre os gêneros presentes neste grupo estão *Pseudomonas* e *Listeria*. Segundo Farrag e Marth (1989), citado por Santos et al. (1999), a espécie *Pseudomonas fluorescens*, além de alterar os alimentos com a produção de enzimas termorresistentes, estimula o desenvolvimento de patógenos como *Listeria monocytogenes* e *E. coli* O157:H7. A presença de um grande número de espécies de microrganismos psicotróficos pode estar relacionada com ocorrência de toxinfecções alimentares humanas ou com

deterioração e perda de qualidade organoléptica dos alimentos (SANTOS et al., 1999)

O ICMSF (1981) estabelece que o limite para populações de microrganismos heterotróficos psicrotróficos em alimentos é de 10^7 UFC.g⁻¹.

Malavota (2008), analisando amostras de sashimis de dois restaurantes, encontrou populações para microrganismos heterotróficos psicrotróficos entre 1,48 a 9,60 Log₁₀ UFC.g⁻¹ ou $3,0 \times 10$ a $4,0 \times 10^9$ UFC.g⁻¹.

Em estudo realizado por Cardoso et al. (2003), foi observado uma variação da população de microrganismos heterotróficos psicrotróficos entre $1,6 \times 10^3$ e $2,3 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ em filés de peixe embalados e congelados.

Almeida-Filho et al. (2002) ao analisarem pescados *in natura* comercializados em feiras livres e supermercados, observaram médias de $5,3 \times 10^5$ e $7,7 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ para esses microrganismos, respectivamente.

3.3. Coliformes e *Escherichia coli*

As bactérias do grupo coliforme são consideradas os principais indicadores de contaminação fecal. O grupo coliforme é formado por vários gêneros bacterianos, destacando-se *Klebsiella*, *Escherichia*, *Serratia*, *Erwenia*, *Enterobacter* e *Citrobacter*. Todas as bactérias coliformes são Gram-negativas, não esporuladas e estão associadas com as fezes de animais endotérmicos e com o solo (PELCZAR, 1981).

Escherichia é um gênero pertencente à família Enterobacteriaceae. Diferente da *Salmonella* e da *Shigella*, muitas *Escherichia* são capazes de fermentar a lactose produzindo ácido e gás. O gênero *Escherichia* contém seis espécies: *E. coli*, *E. adecarboxylata*, *E. fergusonii*, *E. hermanii*, *E. vulneris* e *E. blattae*, sendo a *E. coli* seu principal representante (VARNAM; EVANS, 1991).

E. coli está presente no trato gastrointestinal dos seres humanos e outros animais, sendo considerada um microrganismo patogênico oportunista, causando infecção ou intoxicação alimentar em casos particulares. Seu principal papel na microbiologia alimentar é de indicador de contaminação fecal, contribuindo para avaliar a qualidade de alimentos e água (VIEIRA et al., 2004a).

No Brasil, em pescados crus, refrigerados ou congelados, é tolerada a presença de até 10^2 NMP.g⁻¹ para coliformes termotolerantes. Caso seja determinada a presença de *Escherichia coli*, deve constar no laudo analítico (BRASIL, 2001).

Fontes et al. (2007) analisando pescados vendidos numa cidade do interior de Portugal, observaram que 30,0% de suas amostras apresentavam número de coliformes termotolerantes acima do limite aceitável, no entanto *E. coli* não foi isolada.

Resende (2004) ao analisar sushis e sashimis na cidade de Brasília – DF observou que 25,0% das amostras apresentaram valores acima do permitido em relação à população de coliformes termotolerantes. Já, na cidade de São Paulo, 50,0% das 20 amostras de preparações a base de peixe cru (sushi e sashimi) analisadas por Martins (2006) apresentaram-se fora da legislação para o mesmo grupo microbiano. A presença da *E. coli* foi observada em 45,0% das amostras.

Farias (2008), analisando 24 amostras de ostras da Baía de Guaratuba - PR verificou que 83,0% das amostras apresentavam coliformes totais e que 16,7% apresentavam a bactéria *E. coli*

Nespolo (2009), analisando 31 amostras de salmão (15 congeladas e 16 refrigeradas) encontrou em 32,2% e 19,3% delas, coliformes totais e coliformes termotolerantes, respectivamente. Não foi encontrada a presença de *E. coli*.

Santos (2012), analisando 35 amostras de sushis comercializados em 7 restaurantes de Aracaju - SE, verificou que 80,0% das amostra apresentavam populações de coliformes termotolerantes acima do limite previsto pela legislação brasileira.

3.4. *Salmonella* spp.

As salmonelas são microrganismos pertencentes à família Enterobacteriaceae. São Gram negativos, se apresentam em forma de bacilos, são oxidase negativos e catalase positivos, não formam esporos, são anaeróbios facultativos, fermentam glicose e reduzem o nitrato. A maioria é móvel, por meio de flagelos peritríquios, exceção feita à *S. Pullarum* e à *S. Gallinarum*, que são imóveis.

A temperatura de multiplicação varia de 5°C a 45°C, sendo a temperatura ótima de 37°C (VARNAM; EVANS, 1991).

O gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies, *S. bongori*, e *S. enterica*. A espécie *S. enterica* esta dividida em seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae* e *S. enterica* subespécie *indica* (POPOFF et al., 2004). O ser humano parece ser susceptível a todos eles e as fontes de infecções importantes são os animais sendo seus subprodutos o veículo de transmissão (HIRSH, 2003).

Aproximadamente 2000 sorotipos causam doenças em humanos, afetando todas as faixas etárias, sendo os grupos de maior risco pessoas que apresentam doenças severas ou crônicas. Estima-se que, nos Estados Unidos, anualmente ocorram cerca de 1,4 milhões de casos, sendo 40.000 confirmados por cultura microbiológica e, aproximadamente, 400 casos fatais (CDC, 2012a).

No Brasil, em pescados crus, refrigerados ou congelados não se tolera a presença de *Salmonella* spp. em 25 g de alimento (BRASIL, 2001) .

Martins (2006) avaliando 20 amostras de preparações a base de peixe cru comercializadas em São Paulo, não encontrou a bactéria nas amostras.

Nespolo (2009) também não encontrou a presença de *Salmonella* spp. em 31 amostras de salmão (15 congeladas e 16 refrigeradas). Santos et al. (2012) analisando 35 amostras de sushis comercializados em 7 restaurantes de Aracaju, não detectou a presença de microrganismos do gênero *Salmonella*.

Vallandro et al. (2011) avaliaram 108 amostras de sashimis a base de salmão de restaurantes especializados em comida japonesa em Fortaleza - CE, verificando a ausência de *Salmonella* spp. em todas as amostras.

Vieira et al. (2004b) analisaram 90 caranguejos comercializados em Fortaleza -CE e identificaram sete isolados de *Salmonella* spp., das quais cinco foram identificadas como sorovar *S. Senftenberg* e duas como *S. Pomona*. Lourenço et al. (2006) analisaram amostras de carne de caranguejo-içá coletadas em São Caetano de Odivelas e Belém no estado do Pará e encontraram *Salmonella* spp. em 20,0% delas.

3.5. *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* é pertencente à família Micrococcaceae e formado por bactérias Gram positivas, imóveis, de forma esférica, que se agrupam formando massas irregulares na forma de “cachos”. São bactérias anaeróbicas facultativas, catalase positivas e oxidase negativas. São microrganismos mesófilos, considerados mau competidores na presença de outros agentes, se multiplicam em temperaturas entre 7°C a 48°C, sendo a temperatura ideal entre 30°C e 37°C. Para produção de enterotoxinas a temperatura varia de 10°C a 46°C. Em condições ideais, os valores de pH variam de 4,0 a 9,8, sendo o pH ótimo de 6,0 a 7,0. O gênero *Staphylococcus* contém mais de 20 espécies que podem causar diversas doenças nos seres humanos e animais (VARNAM; EVANS, 1991).

Segundo Rodrigues et al. (2004) as intoxicações estafilocócicas têm origem pela ingestão de alimentos contendo enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*.

S. aureus produz vários componentes extracelulares incluindo hemolisinas, enterotoxinas, coagulases, nucleases e lipases. As enterotoxinas são as responsáveis pelos sintomas das intoxicações estafilocócicas e os demais componentes apresentam papel importante em outras doenças causadas pelo microrganismo. As enterotoxinas estafilocócicas são um grupo globular de proteínas de cadeia única, que apresentam peso molecular entre 28.000 e 35.000 Daltons. Apresentam as características de serem: termo-estáveis, solúveis em água e não serem inativadas pela irradiação em doses aceitáveis nos alimentos. São produzidas 7 enterotoxinas imunologicamente distintas: A, B, C₁, C₂, D, E e a toxina do choque tóxico (TST). Todas, exceto a TST, são associadas a intoxicações alimentares, sendo as enterotoxinas A e D as mais frequentemente envolvidas (VARNAM; EVANS, 1991).

Hiluy et al. (1996) avaliaram amostras de peixe, lagosta e camarão (resfriadas e congeladas) no estado do Ceará, e demonstraram a presença de *Staphylococcus aureus* em quantidades acima dos valores permitidos pela legislação, resultando em 20,0% de condenação das amostras de peixe e 50,0% das amostras de camarão.

Martins (2006), avaliando 20 amostras de preparações a base de peixe cru comercializadas em São Paulo - SP verificou que 15,0% de suas amostras apresentavam população de *S. aureus* acima do limite estabelecido na legislação vigente.

Ayulo et al. (1994) avaliaram amostras de carne de peixe, caranguejo, camarão e molusco no litoral de Santa Catarina e isolaram em 20,0% das amostras *Staphylococcus aureus*, sendo 60,0% em mexilhões e 20,0% em carne de caranguejo.

Albuquerque et al. (2006), estudando a ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positivos em sushis comercializados em alguns estabelecimentos de Fortaleza - CE, confirmaram que 43,0% das 30 amostras analisadas encontravam-se fora do padrão estabelecido pela legislação vigente.

Kim et al. (2011) analisando a prevalência de *Staphylococcus aureus* em 3293 amostras de "comidas refrigeradas prontas para comer" (todas variedades de sushi) isolou em 197 amostras o microrganismo, totalizando 5,8% das amostras.

Santos et al. (2012) analisando 35 amostras de sushis comercializados em 7 restaurantes de Aracaju - SE, conseguiram identificar *Staphylococcus aureus* em 20 amostras, sendo que 4 amostras apresentavam populações acima da permitida pela legislação.

3.6. *Vibrio parahaemolyticus*

O gênero *Vibrio* é pertencente à família Vibrionaceae, são bactérias Gram negativas, oxidase-positivas, anaeróbias facultativas e fermentam a glicose sem produzir gás (BUTT, 2004). Apresentam-se em forma de bastão ou vírgula, móveis, devido à presença de flagelo polar simples. Multiplicam em temperaturas entre 5 e 43°C, com ótima de 37°C. Todas as espécies de *Vibrio* se multiplicam em pH alcalino, sendo o pH limite entre 10 e 11. São sensíveis em pH abaixo de 7, entretanto há relatos de desenvolvimento do *V. parahaemolyticus* em pH 4,8. Todos os víbrios enteropatogênicos necessitam de NaCl para multiplicar. Em cultura pura, o ideal é a concentração de 3,0% e o limite para o *V. parahaemolyticus* chega a 8,0% (VARNAM; EVANS, 1991).

V. parahaemolyticus foi isolado pela primeira vez no Japão em 1951, durante uma investigação de um surto de enterite associado a alimento de origem marinha (SAKAZAKI et al., 1963). Na Ásia, *V. parahaemolyticus* tem sido o causador mais comum das doenças veiculadas por alimentos, alcançando cerca de 70,0% dos casos registrados. Segundo Lemoine et al. (1999), citado por Lozano-Leon et al. (2003), no Japão foram registrados 496 surtos durante o período de 1996-1998

Nos Estados Unidos, desde 2007, as infecções pelo *V. parahaemolyticus* e outros vibrios tornaram-se doenças de notificação nacional e estima-se que anualmente ocorram cerca de 4500 casos relacionados ao agente *V. parahaemolyticus* (CDC, 2012b).

Leitão e Arima (1975) avaliaram a incidência de *V. parahaemolyticus* em amostras de moluscos, peixes e crustáceos coletadas no litoral do Estado de São Paulo e constataram que 100,0% das amostras de ostras estavam contaminadas. Nos peixes a contaminação foi de 3,3% e nos crustáceos foi 6,6%.

Rodrigues (2009) relata em seu trabalho que população de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras varia por estação do ano e é maior no verão, sendo as variáveis do ambiente como temperatura e salinidade do cultivo, fatores que influenciaram a presença do microrganismo em ostras. Chiou et al. (2000) registraram que os surtos são menos prevalentes durante o inverno.

Vieira et al. (2004b) analisando 90 caranguejos comercializados em Fortaleza - CE, isolaram 45 estirpes de *Vibrio* spp., sendo oito dessas da espécie *V. parahaemolyticus*.

Martins (2006), avaliando 20 amostras de preparações a base de peixe cru comercializadas em São Paulo – SP, isolou em 35,0% delas espécies de Vibrios potencialmente patogênicos. Entretanto, a presença de *V. parahaemolyticus* não foi detectada.

Pereira et al. (2007) analisando 15 amostras de mexilhões (*Perna perna*) coletadas na região de Niterói - RJ, verificaram a presença de *V. parahaemolyticus* em 7,7% das amostras.

Vallandro et al. (2011) avaliaram 108 amostras de sashimis a base de salmão de restaurantes especializados em comida japonesa em Fortaleza - CE, constatando a ausência de *Vibrio parahaemolyticus* em todas as amostras

Tendo em vista os conhecimentos que a humanidade adquiriu ao longo dos anos sobre os riscos de transmissão de agentes como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Vibrio parahaemolyticus*, é fundamental exigir um “alimento seguro” e de boa qualidade. Sendo assim, com a expansão da culinária japonesa, com as técnicas microbiológicas de avaliação qualitativa e por meio da quantificação de microrganismos indicadores, esse trabalho avaliou uma pequena parte desse setor crescente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com 30 amostras de sushis *in natura*, conservados refrigerados (constituído obrigatoriamente de arroz temperado e salmão (*Salmo salar*), podendo apresentar outros ingredientes como algas, molhos e legumes). As amostras foram coletadas em quinze restaurantes especializados em comidas japonesas e em quinze estabelecimentos comerciais não especializados, sendo adquirido uma amostra para cada local.

- **Estabelecimentos especializados:** são restaurantes que obrigatoriamente trabalham somente com a culinária japonesa, normalmente oferecendo para o cliente o serviço de rodízio, "a la carte" ou "self service" por quilo.
- **Estabelecimentos não especializados:** nessa categoria foram enquadrados os restaurantes comuns que diariamente oferecem ao cliente a tradicional comida brasileira incorporando em seu cardápio outros tipos de culinária, incluindo a japonesa ("fast foods", "self services", churrascarias, etc.).

4.1. Colheita, acondicionamento e transporte das amostras

As amostras foram adquiridas no comércio das cidades de Jaboticabal - SP, Ribeirão Preto – SP e Monte Alto - SP. As quantidades de sushis adquiridas variavam de acordo com o "menu" oferecido pelo estabelecimento. Quando o estabelecimento oferecia a opção de venda por peso, aproximadamente 400g de sushi eram pesados para compra. Todas as amostras adquiridas foram embaladas na forma comum de venda ao consumidor.

Imediatamente após a compra, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo blocos de gelo e encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos de Origem Animal e Água do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/Unesp, onde foram submetidas às análises.

4.2. Metodologia empregada

4.2.1. Preparo das diluições das amostras (APHA, 2001)

De cada amostra foram pesadas, assepticamente, 25 gramas, as quais foram colocadas em frascos contendo 225 mL de água peptonada a 0,1%, esterilizada. A mistura foi homogeneizada em aparelho Stomacher por um minuto, obtendo a diluição inicial de 10^{-1} . Após esse processo foram realizadas diluições decimais até 10^{-7} utilizando-se o mesmo diluente.

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

Foram depositados 1 mL de cada diluição no fundo de placas de Petri esterilizadas, em quadruplicata. A seguir, adicionados 15 mL a 17 mL de ágar padrão para contagem (PCA) fundido e resfriado a temperatura em torno de 45°C. Após a homogeneização e solidificação do ágar a temperatura ambiente, duas placas foram incubadas a 35°C por 48 horas para a quantificação de mesófilos, e as outras duas placas restantes, incubadas a 7°C por 10 dias para quantificação de psicrotróficos. As contagens foram realizadas no contador de colônia segundo a técnica padrão, dando preferência as placas com 25 a 250 colônias.

4.2.3. Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais/grama (APHA, 2001)

Teste presuntivo: três séries de tubos de caldo lauril sulfato triptose, com tubo de Durhan invertido, foram inoculados com 1 mL a partir das diluições de 10^{-1} a 10^{-7} . Após serem incubados a 35°C por 24 a 48 horas, as culturas que produziram gás foram consideradas positivas.

Teste confirmativo: de cada tubo com resultado positivo no teste presuntivo foi transferida uma alçada da cultura (alça de níquel-cromo de 3 mm de diâmetro) para tubos correspondentes contendo caldo lactose-verde brilhante-bile a 2,0% e tubo de Durhan invertido. Após o processo foi realizada a incubação a 35°C por 24 a 48 horas e considerados positivos os desenvolvimentos bacterianos que produziram gás neste período.

De acordo com o número de tubos positivos e, empregando a tabela de Hoskins, foi determinado o NMP de coliformes totais por grama.

4.2.4. Determinação do NMP de coliformes termotolerantes/grama e *Escherichia coli* (APHA, 2001)

Coliformes termotolerantes: a partir de cada tubo de caldo lauril sulfato triptose com resultado positivo no teste presuntivo para coliformes totais, foram inoculados com alça, tubos correspondentes contendo caldo EC e tubo de Durhan invertido. A incubação foi realizada em banho-maria a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 horas e considerados positivos os tubos com multiplicação bacteriana e produção de gás. De acordo com o número de tubos positivos e, empregando a tabela de Hoskins, foi determinado o NMP de coliformes termotolerantes por grama.

Escherichia coli: a partir dos tubos com resultados positivos para coliformes termotolerantes em caldo EC, foram semeadas placas de ágar eosina-azul de metileno (EMB) e em seguida encubadas a 35°C por 24 horas. Após o período e havendo desenvolvimento de colônias, foram transferidas de cada placa, três colônias características (cor negra, chata, seca e com brilho metálico), para ágar nutriente inclinado. Após incubação a 35°C por 24 horas, realizou-se coloração de Gram em cada tubo, para a verificação da morfologia dos isolados. Constatada a presença de bacilos Gram-negativos, em cultura pura, esses foram semeados em meios para confirmação bioquímica através das provas do IMViC ou seja: produção de indol (I), Vermelho de Metila (VM), Voges-Proskauer (VP) e do aproveitamento de citrato (C). Na realização dessas provas, foram adotadas metodologias descritas em Mac Faddin (1976).

As culturas que se apresentavam em forma de bacilos Gram negativos e, que ao teste do IMViC apresentaram resultados + + - - ou - + - -, foram consideradas como de *E. coli*.

O NMP de *E. coli* foi obtido considerando-se as porções positivas para esta bactéria e empregando-se a Tabela de Hoskins.

4.2.5. Contagem de *Staphylococcus coagulase positivo* e pesquisa de *Staphylococcus aureus* (APHA, 2001)

Das diluições de 10^{-1} a 10^{-4} foram retirados 0,2 mL e depositados em placas de Petri contendo Ágar de Baird-Parker. A seguir, com um auxílio de um bastão de vidro em forma de "L" esterilizado, foi realizada a distribuição do inóculo por toda a superfície do meio e as placas incubadas a 35°C por 24 a 48 horas.

Após a incubação, foram contadas as colônias presentes nas placas entre 20 e 200 colônias, separadamente. Foram consideradas para a contagem as colônias negras e brilhantes, com ou sem zona de precipitação ao redor e circundadas ou não por halo claro. A seguir, 3 a 5 colônias com as características consideradas, foram semeadas em tubos com ágar nutriente inclinado e incubadas a 35°C por 24 horas. Após incubação, esfregaços foram preparados e corados pelo método de

Gram e as culturas que se apresentavam na forma de cocos Gram-positivos, formando massas irregulares em forma de cachos de uva, foram submetidas às provas da catalase e oxidação e fermentação da glicose (O/F), para confirmação do gênero.

Isolados com resultados positivos nas provas confirmativas do gênero *Staphylococcus* foram submetidas à prova da coagulase livre.

Dentre as cepas coagulase positivas, foi confirmada a presença de *Staphylococcus aureus* através das provas de fermentação do manitol em anaerobiose e da produção de acetoina (VP) (MAC FADDIN, 1976).

4.2.6. Isolamento de bactérias do gênero *Salmonella* (APHA, 2001)

Pré-enriquecimento: de cada amostra foi retirado, assepticamente, 25 gramas e adicionados a 225 mL de água peptonada a 1,0%. Após homogeneização em aparelho Stomacher, a mistura foi incubada a 37°C por 24 horas.

Enriquecimento seletivo: duas alíquotas, uma de 1 mL e outra de 0,1 mL 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 solução de novobiocina a 0,4%, dando uma concentração de 40 microgramas do princípio ativo por mililitro do meio. Em seguida, os caldos seletivos foram incubados a 37°C por 24 horas.

Plaqueamento seletivo: com auxílio de uma 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.

Identificação presuntiva: 3 a 5 colônias, com características sugestivas do gênero *Salmonella*, obtidas no plaqueamento seletivo seriam retiradas com auxílio de agulha de níquel-cromo previamente flambada e inoculadas em tubos contendo ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e meio para a realização da prova da descarboxilação da lisina (LIA).

Confirmação sorológica: para tal, cultivos que, na identificação presuntiva, apresentassem reações condizentes com o gênero seriam transferidos com alça de níquel-cromo para lâminas de vidro contendo gotas de solução fisiológica. Após

homogeneização da colônia com a solução fisiológica na lâmina, seria acrescentada uma gota de soro anti-salmonela polivalente somático-O, seguido de movimentação da lâmina para leitura. Se ocorresse aglutinação na mistura, a prova seria considerada positiva. O mesmo procedimento seria realizado para o soro polivalente flagelar-H. Seria considerada como gênero *Salmonella* o cultivo que apresentasse positividade em ambas as provas.

4.2.7. Isolamento do *Vibrio parahaemolyticus* (APHA, 2001)

Inicialmente 25 gramas de cada uma das amostras foram adicionadas a soluções contendo 225 mL de salina fosfatada tamponada (PBS) esterilizada. Após incubação a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas, o material pré-enriquecido foi semeado pelo método de esgotamento em placas de Petri contendo ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS). Após, as placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas.

Na etapa seguinte, 3 a 5 colônias típicas de cada amostra, ou seja, opacas, verde-azuladas com 2 a 3 mm de diâmetro, seriam inoculadas em ágar arginina glicose inclinado (AGS) e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas. Após o período de incubação, as amostras presuntivas de *Vibrio parahaemolyticus* apresentariam desenvolvimento com acidificação na base (arginina dehidrolase negativa) e alcalinização no bisel, sem produção de H_2S e de gás. Seriam inoculados também, por picada profunda, tubos com meio semi-sólido para teste de motilidade.

As culturas móveis, Gram negativas, que produzissem ácido na base e fossem alcalinas no bisel em ágar AGS, e não formassem gás seriam submetidas às provas da oxidase, hidrólise da arginina, descarboxilação da lisina, crescimento em caldo nutriente com 0% a 10,0% de cloreto de sódio, crescimento a 42°C , fermentação da sacarose, da D-celobiose, da lactose, da arabinose, da D-manose e do D-manitol, ONPG, Voges-Proskauer (VP), sensibilidade a $10\mu\text{g}$ e $150\mu\text{g}$ do agente vibriostático O/129, gelatinase e urease para a confirmação da espécie. Estas provas seriam realizadas através da metodologia descrita em Mac Faddin (1976).

A diferenciação do *Vibrio parahaemolyticus* e *V. vulnificus* se daria através do desenvolvimento exclusivo até a 8,0% de cloreto de sódio, pela fermentação variável

da D-celobiose, fermentação da arabinose, pela resistência no teste de sensibilidade a 10µg do agente vibriostático O/129 e variabilidade na produção de urease.

Todas as cepas identificadas bioquimicamente como *Vibrio parahaemolyticus* seriam submetidas ao teste de Kanagawa. Para isso o microrganismo suspeito seria inoculado em caldo soja tripticase (TSB) com 3,0% de cloreto de sódio e incubado a 35 ±2°C por 18 a 24 horas. Após esse período, seriam inoculadas várias gotas, com ajuda de alça de níquel-cromo, em placas contendo ágar Wagatsuma. Após a incubação a 35 ±2°C por 18 a 24 horas, seriam realizadas as leituras.

4.3. Análise Estatística

As amostras de sushis que atenderam ao padrão microbiológico pré-estabelecido receberam a classificação “1 (sucesso)”; e as amostras que não atenderam receberam a classificação “0 (fracasso)”. A comparação das proporções dos resultados de sucessos e fracassos foi realizada pelo teste de Qui-quadrado ao nível de 5,0% ou teste exato de Fisher ao nível de 5,0% quando o Qui-quadrado foi inviável (CDC, 2013).

Os lugares de onde as amostras foram coletadas receberam classificações de “restaurantes especializados em comida japonesa” ou “estabelecimentos não especializados” (hipermercado, supermercado, feiras, fast-foods e restaurantes com comidas variadas). Os resultados obtidos foram convertidos em logaritmo de x+1 e através do teste t student (SAS, 2005), foi verificado se há ou não diferença quanto à ocorrência de microrganismos nos produtos comercializados nos dois tipos de estabelecimentos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 refere-se aos resultados das contagens padrão em placas de microrganismos heterotróficos mesófilos, obtidas em cada uma das amostras, com sua classificação quanto ao tipo de estabelecimento onde o sushi foi adquirido, médias aritméticas e desvio padrão dos resultados obtidos.

Tabela 1. População de microrganismos heterotróficos mesófilos em cada uma das amostras de sushi *in natura* coletadas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa, com as médias aritméticas e desvio padrão dos resultados obtidos. (Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto – SP, 2011 e 2012)

Número da amostra	Tipos de Estabelecimentos	
	Especializados (Pop. UFC.g ⁻¹)	Não especializados (Pop. UFC.g ⁻¹)
1	1,6 x 10 ⁷	1,7 x 10 ⁷
2	1,2 x 10 ⁶	7,1 x 10 ⁴
3	9,0 x 10 ⁵	6,3 x 10 ³
4	1,2 x 10 ⁵	5,9 x 10 ³
5	1,0 x 10 ⁷	8,5 x 10 ⁵
6	7,9 x 10 ²	7,5 x 10 ⁶
7	5,2 x 10 ⁴	6,6 x 10 ⁴
8	9,6 x 10 ⁴	1,5 x 10 ³
9	1,2 x 10 ⁶	6,3 x 10 ³
10	4,7 x 10 ³	5,4 x 10 ⁵
11	3,9 x 10 ²	7,7 x 10 ⁵
12	4,3 x 10 ³	4,6 x 10 ⁵
13	1,8 x 10 ⁴	7,8 x 10 ⁴
14	6,9 x 10 ⁴	1,1 x 10 ⁵
15	1,0 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁵
Médias aritméticas e desvio padrão	2,0 x 10 ⁶ ± 4,6 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁶ ± 4,6 x 10 ⁶

Os valores das populações de microrganismos heterotróficos mesófilos, conforme pode ser verificado na Tabela 1, variaram de 3,9 x 10² a 1,7 x 10⁷ UFC.g⁻¹.

Na Tabela 1, as médias de populações de microrganismos heterotróficos mesófilos nas amostras coletadas em restaurantes especializados e restaurantes não especializados são respectivamente $2,0 \times 10^6$ e $1,8 \times 10^6$ UFC.g⁻¹. Aplicado o teste t de Student aos valores dessas populações, as diferenças entre as médias não foram significativas do ponto de vista estatístico ($p > 0,05$). Isso significa que não houve diferença entre as populações de microrganismos mesófilos encontrados nos produtos adquiridos em restaurantes especializados e não especializados.

A Tabela 2 apresenta a distribuição das amostras de sushi *in natura* segundo o exponencial de microrganismos heterotróficos mesófilos, com sua classificação quanto ao tipo de estabelecimento onde o sushi foi adquirido.

Tabela 2. Distribuição das amostras de sushi *in natura*, coletadas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa, segundo o exponencial de microrganismos heterotróficos mesófilos. (Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto – SP, 2011 e 2012)

Exponencial de microrganismos mesófilos (UFC.g ⁻¹)	Número de amostras (%)		Total (%)
	Especializados	Não especializados	
10 ²	2 (13,3)	0 (0,0)	2 (6,7)
10 ³	2 (13,3)	4 (26,7)	6 (20,0)
10 ⁴	5 (33,3)	3 (20,0)	8 (26,7)
10 ⁵	2 (13,3)	6 (40,0)	8 (26,7)
10 ⁶	2 (13,3)	1 (6,7)	3 (10,0)
10 ⁷	2 (13,3)	1 (6,7)	3 (10,0)
Total de amostras	15 (100,0)	15 (100,0)	30 (100,0)

Na Tabela 2 as maiores porcentagens de amostras encontraram-se com populações de exponenciais de 10^4 UFC.g⁻¹ e 10^5 UFC.g⁻¹, totalizando cada 26,7% das amostra analisadas. Populações acima de 10^6 UFC.g⁻¹ foram encontradas em 6 amostras, equivalendo a 20,0% do total analisado.

Segundo o ICMSF (1981), a população de microrganismos mesófilos encontrada em um alimento, é um dos indicadores da sua qualidade e não deve ser superior a 10^6 UFC.g⁻¹. Uma população elevada desses microrganismos pode indicar contaminação excessiva da matéria-prima ou durante a preparação, bem como condições inadequadas de limpeza e sanitização. Erros no processo de

conservação e transporte também contribuem para aumentar as populações desses microrganismos. Segundo Jay (2005), populações acima de 10^6 UFC.g⁻¹ podem ser responsáveis pelo desencadeamento de doenças de origem alimentar.

Não existe na legislação brasileira um limite definido sobre o número aceitável de microrganismos mesófilos, sendo assim procurou-se estabelecer uma comparação com valores citados na literatura.

Agnese et al. (2001), por exemplo, relatam que valores de mesófilos superiores a 10^6 UFC.g⁻¹ de carne de peixe são considerados críticos com relação ao seu frescor. Utilizando o mesmo critério, 20,0% das amostras analisadas seriam consideradas críticas quanto ao seu frescor e também condenadas pelos parâmetros do ICMSF (1981). Entretanto, as características sensoriais de deterioração, má aparência e odor fétido, não foram detectadas em nenhuma das amostras analisadas.

Lira et al. (2001) observaram que alguns pescados que apresentaram mesófilos com populações superiores a 10^6 UFC.g⁻¹ não estavam com suas características sensoriais alteradas, enquanto que outros com número inferior, na análise sensorial eram desclassificados.

Isso demonstra que as alterações das características sensoriais de um alimento não dependem da quantidade elevada de microrganismos mesófilos, tornando-se um problema para saúde pública, já que as mudanças de aspecto visual ou olfativo são fatores extremamente relevantes para o descarte de produtos impróprios para consumo. Segundo a literatura, quanto mais altas as populações bacterianas em um alimento, maior o potencial de transmissão de doenças.

Considerando microrganismos mesófilos, Gilbert et al. (2000) apresentam uma tabela de classificação da qualidade de alimentos a base de peixes marinhos crus, em que produtos com populações inferiores a 10^3 UFC.g⁻¹ são considerados adequados para consumo, entre 10^3 e 10^4 são satisfatórios e acima de 10^4 UFC.g⁻¹ são considerados insatisfatórios. Levando-se em consideração esta classificação, pode-se afirmar que 73,3% das amostras coletadas corresponderiam a produtos considerados insatisfatórios para a comercialização.

Resultados parecidos foram encontrados por Santos et al. (2011), sendo que ao analisarem 24 amostras de temakis grelhados, verificaram que 87,5% das amostras apresentaram valores acima de 10^5 UFC.g⁻¹ para microrganismos mesófilos. Muratori et. al. (2004), em Teresina - PI, identificaram populações

elevadas de microrganismos heterotróficos mesófilos, entre 10^5 e 10^6 UFC.g⁻¹, em 55,9% das amostras de pescado *in natura*.

A Tabela 3 refere-se aos resultados das contagens padrão em placas de microrganismos heterotróficos psicrotróficos, obtidas em cada uma das amostras, com sua classificação quanto ao tipo de estabelecimento em que o sushi foi adquirido, médias aritméticas e desvio padrão dos resultados obtidos.

Tabela 3. População de microrganismos heterotróficos psicrotróficos em cada uma das amostras de sushi *in natura*, coletadas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa, com as médias aritméticas e desvio padrão dos resultados obtidos. (Jaboticabal, Ribeirão Preto Monte e Alto – SP, 2011 e 2012)

Número da amostra	Tipos de Estabelecimentos	
	Especializados (Pop. UFC.g ⁻¹)	Não especializados (Pop. UFC.g ⁻¹)
1	$1,4 \times 10^9$	$1,3 \times 10^8$
2	$9,7 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$
3	$7,7 \times 10^5$	$7,3 \times 10^3$
4	$9,7 \times 10^4$	$7,0 \times 10^3$
5	$1,1 \times 10^7$	$9,1 \times 10^5$
6	$1,7 \times 10^4$	$1,7 \times 10^7$
7	$9,9 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$
8	$8,9 \times 10^4$	$7,5 \times 10^2$
9	$1,4 \times 10^6$	$1,0 \times 10^4$
10	$3,8 \times 10^4$	$1,7 \times 10^6$
11	$1,0 \times 10^3$	$7,1 \times 10^6$
12	$5,7 \times 10^3$	$6,6 \times 10^5$
13	$1,2 \times 10^4$	$5,8 \times 10^4$
14	$5,9 \times 10^5$	$9,7 \times 10^5$
15	$1,4 \times 10^4$	$5,6 \times 10^6$
Médias aritméticas e desvio padrão	$9,4 \times 10^7 \pm 3,6 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7 \pm 3,3 \times 10^7$

Os valores das populações de microrganismos psicrotróficos, conforme pode ser verificado na Tabela 3, variaram de $7,5 \times 10^2$ a $1,4 \times 10^9$ UFC.g⁻¹. Resultados

semelhantes foram descritos por Malavota (2008), que analisando amostras de sashimis de dois restaurantes, encontrou populações para microrganismos heterotróficos psicrotróficos entre $3,0 \times 10$ a $4,0 \times 10^9$ UFC.g⁻¹. Em estudo realizado por Cardoso et al. (2003) foi observado uma variação da população de microrganismos heterotróficos psicrotróficos entre $1,6 \times 10^3$ e $2,3 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ em filés de peixe embalados e congelados.

Na Tabela 3, as médias de populações de microrganismos heterotróficos psicrotróficos nas amostras coletadas em restaurantes especializados e restaurantes não especializados são respectivamente $9,4 \times 10^7$ e $1,1 \times 10^7$ UFC.g⁻¹. Aplicado o teste t de Student aos valores dessas populações, as diferenças entre as médias não foram significativas do ponto de vista estatístico ($p > 0,05$). Isso significa que não houve diferença entre as populações de microrganismos psicrotróficos encontradas nos produtos comercializados em restaurantes especializados e não especializados.

A Tabela 4 apresenta a distribuição das amostras de sushi *in natura* segundo o exponencial de microrganismos heterotróficos psicrotróficos, com sua classificação quanto ao tipo de estabelecimento onde o sushi foi adquirido.

Tabela 4. Distribuição das amostras de sushi *in natura*, coletadas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa, segundo o exponencial de microrganismos heterotróficos psicrotróficos. (Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto – SP, 2011 e 2012)

Exponencial de microrganismos psicrotróficos (UFC.g ⁻¹)	Número de amostras (%)		Total (%)
	Especializados	Não especializados	
10 ²	0 (0,0)	1 (6,7)	1 (3,3)
10 ³	2 (13,3)	2 (13,3)	4 (13,3)
10 ⁴	6 (40,0)	2 (13,3)	8 (26,7)
10 ⁵	4 (26,7)	4 (26,7)	8 (26,7)
10 ⁶	1 (6,7)	4 (26,7)	5 (16,7)
10 ⁷	1 (6,7)	1 (6,7)	2 (6,7)
10 ⁸	0 (0,0)	1 (6,7)	1 (3,3)
10 ⁹	1 (6,7)	0 (0,0)	1 (3,3)
Total de amostras	15 (100,0)	15 (100,0)	30 (100,0)

Na Tabela 4, as maiores porcentagens de amostras analisadas encontraram-se com populações de exponenciais de 10^4 UFC.g⁻¹ e 10^5 UFC.g⁻¹, totalizando cada

intervalo 26,7%. Segundo Reinbold (1983) a população de microrganismos aeróbios psicrotróficos avalia o grau de deterioração de alimentos refrigerados. Considerando que para microrganismos psicrotróficos, valores acima de 10^4 UFC.g⁻¹ são relativamente altos, e que o sushi é um alimento com alto potencial de deterioração (sendo preparado manualmente e apresentando como ingrediente o pescado cru), 83,3% das amostras analisadas não teriam um amplo prazo de validade sob refrigeração.

Na legislação brasileira, também não existe um limite definido sobre o número aceitável de microrganismos psicrotróficos. Segundo o ICMSF (1981) o limite para populações de microrganismos heterotróficos psicrotróficos em alimentos é de 10^7 UFC.g⁻¹. Levando-se em consideração este parâmetro, pode-se afirmar que 13,3% das amostras coletadas corresponderiam a produtos insatisfatórios para a comercialização.

Malavota (2008) por outro lado, analisando amostras de sashimis de dois restaurantes, encontrou em 50,0% dos alimentos testados populações para microrganismos heterotróficos psicrotróficos acima do limite tolerado, segundo o ICMSF (1981). A porcentagem de amostras insatisfatórias encontrada pelo autor citado é superior aos 13,3% encontrado no presente estudo.

A Tabela 5 apresenta os resultados das populações de *Staphylococcus* sp., obtidas em cada uma das amostras, com a classificação quanto ao tipo de estabelecimento onde o sushi foi adquirido e as médias aritméticas dos resultados obtidos.

Tabela 5. População de *Staphylococcus* sp. em cada uma das amostras de sushi *in natura* coletadas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa, com as médias aritméticas e desvio padrão dos resultados obtidos. (Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto – SP, 2011 e 2012)

Número da amostra	Tipos de Estabelecimentos	
	Especializados (Pop. UFC.g ⁻¹)	Não especializados (Pop. UFC.g ⁻¹)
1	3,8 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁵
2	5,8 x 10 ³	6,9 x 10 ⁴
3	2,6 x 10 ³	2,8 x 10 ³
4	2,2 x 10 ³	3,5 x 10 ²
5	1,8 x 10 ³	3,7 x 10 ³
6	2,5 x 10 ²	2,8 x 10 ⁴
7	2,0 x 10 ³	4,8 x 10 ³
8	2,8 x 10 ³	4,2 x 10 ³
9	8,6 x 10 ⁴	1,4 x 10 ³
10	2,4 x 10 ³	1,3 x 10 ⁴
11	2,0 x 10 ²	4,2 x 10 ³
12	2,0 x 10 ³	6,4 x 10 ⁴
13	1,0 x 10 ³	5,2 x 10 ³
14	3,5 x 10 ⁴	3,4 x 10 ⁴
15	1,0 x 10 ³	2,2 x 10 ³
Médias aritméticas e desvio padrão	3,5 x 10 ⁴ ± 9,8 x 10 ⁴	3,3 x 10 ⁴ ± 6,7 x 10 ⁴

Dentre as 30 amostras analisadas, conforme pode ser observado na Tabela 5 todas apresentaram *Staphylococcus* sp., com populações que variaram de 2,0 x 10² a 3,8 x 10⁵ UFC.g⁻¹. Diferentemente, Santos et al. (2012), analisando 32 amostras de sushis comercializados em restaurantes de Aracaju - SE, identificaram *Staphylococcus* sp. em apenas 20 amostras, totalizando 57,1% delas. Bactérias desse gênero fazem parte da microbiota normal da pele humana, podendo acontecer contaminação do alimento durante a manipulação, principalmente quando não se utilizam equipamentos de proteção e formas de assepsias adequadas. O

sushi é um alimento que, por tradição, é confeccionado manualmente tornando-se um produto com alto potencial de contaminação para esse microrganismo.

Na Tabela 5, as médias das populações de *Staphylococcus* sp. nas amostras coletadas em restaurantes especializados e restaurantes não especializados são respectivamente $3,5 \times 10^4$ e $3,3 \times 10^4$ UFC.g⁻¹. Aplicado o teste t de student aos valores dessas populações, as diferenças entre as médias não foram significativas do ponto de vista estatístico ($p > 0,05$). Isso significa que não houve diferença entre as populações de *Staphylococcus* sp. encontradas nos produtos adquiridos nos restaurantes especializados e não especializados.

A Tabela 6 refere-se à distribuição das amostras de sushi *in natura* segundo o exponencial da população de *Staphylococcus* sp.

Tabela 6. Distribuição das amostras de sushi *in natura* coletadas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa, segundo o exponencial das populações *Staphylococcus* sp. (Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto – SP, 2011 e 2012)

Exponencial das populações de <i>Staphylococcus</i> sp. (UFC.g ⁻¹)	Número de amostras (%)		Total (%)
	Especializados	Não especializados	
10 ²	2 (13,3)	1 (6,7)	3 (10,0)
10 ³	10 (66,7)	8 (53,3)	18 (60,0)
10 ⁴	2 (13,3)	5 (33,3)	7 (23,3)
10 ⁵	1 (6,7)	1 (6,7)	2 (6,7)
Total de amostras	15 (100,0)	15 (100,0)	30 (100,0)

Na Tabela 6 é possível verificar que a maior porcentagem de amostras com população de *Staphylococcus* sp. encontra-se com exponencial de 10³ UFC.g⁻¹, totalizando 60,0% delas.

A Tabela 7 apresenta os resultados das populações de estafilococos coagulase positivo nas amostras de sushi *in natura*, distribuídos segundo o tipo de estabelecimentos em que foram adquiridos e as amostras em que foi confirmada a presença de *Staphylococcus aureus*.

Tabela 7. Populações de estafilococos coagulase positivo nas amostras de sushi *in natura*, distribuídos segundo o tipo de estabelecimentos em que foram adquiridos e as amostras em que foi confirmada a presença de *Staphylococcus aureus*. (Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto – SP, 2011 e 2012)

Número da amostra	Estabelecimentos especializados (Pop. UFC.g ⁻¹)	<i>Staphylococcus aureus</i> confirmado
1	7,5 x 10 ⁴ *	X
4	4,5 x 10 ²	X
10	4,9 x 10 ²	X
Estabelecimentos não especializados (Pop. UFC.g ⁻¹)		
1	5,1 x 10 ⁴ *	X
5	7,4 x 10 ²	
6	5,7 x 10 ³ *	
12	1,2 x 10 ⁴ *	X

* Amostras fora do padrão para *Staphylococcus* coagulase positivo. Valor acima de 5,0 x 10³ UFC.g⁻¹ segundo RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

Após a caracterização bioquímica das cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas, foi possível verificar a presença de *Staphylococcus* coagulase positivo em 7 amostras das 30 analisadas, totalizando 23,3% das amostras (Tabela 7). Dessas 7 amostras, apenas 4 apresentaram valores de populações acima de 5,0 x 10³ UFC.g⁻¹, limite máximo estabelecido pela Resolução - RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001, para alimentos similares (BRASIL, 2001). Conseqüentemente, 13,3% do total das amostras analisadas estariam insatisfatórias para o consumo. Resultados semelhantes foram relatados por Santos et al. (2012), ao avaliarem sushis comercializados em restaurantes de Aracaju - Sergipe, em que 11,4% das

amostras apresentaram valores acima do limite para *Staphylococcus* coagulase positivo.

Já, Albuquerque et al. (2006), estudando a ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positivos em sushis comercializados em alguns estabelecimentos de Fortaleza - CE, confirmaram que 43,0% das 30 amostras analisadas encontravam-se fora do padrão estabelecido, concluindo que esses resultados eram decorrentes da higiene inadequada dos manipuladores ou contaminação cruzada. Essa conclusão também pode explicar a ocorrência de amostras fora do padrão encontradas nesse trabalho, mesmo a porcentagem sendo menor.

A presença *Staphylococcus aureus*, Tabela 7, foi confirmada em 5 amostras, sendo elas: 1, 4 e 10 do grupo de estabelecimentos especializados e, no grupo de estabelecimentos não especializados, apenas nas amostras 1 e 12 foi encontrado o microrganismo. Sendo assim, em 16,7% do total de amostras analisadas confirmou-se a presença de *Staphylococcus aureus*. Uma porcentagem menor foi encontrada por Kim et al. (2011) ao analisarem a prevalência de *Staphylococcus aureus* em 3.293 amostras de "comidas refrigeradas prontas para consumo" (todas variedades de sushi), que isolaram o microrganismo em 197 delas, totalizando apenas 5,8% das amostras.

A Tabela 8 refere-se aos resultados da população de coliformes totais e coliformes termotolerantes, obtidas em cada uma das amostras, com classificação quanto ao tipo de estabelecimento em que o sushi foi adquirido e médias aritméticas dos resultados obtidos.

Tabela 8. Populações de coliformes totais e coliformes termotolerantes (NMP.g⁻¹) em cada uma das amostras de sushi *in natura*, coletadas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa e médias aritméticas dos resultados obtidos. (Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto – SP, 2011 e 2012)

Número da amostra	Coliformes totais (Pop. NMP.g ⁻¹)		Coliformes termotolerantes (Pop. NMP.g ⁻¹)	
	Especializados	Não especializados	Especializados	Não especializados
1	1,1 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁴	4,6 x 10 ⁴ *	2,1 x 10 ³ *
2	7,2 x 10	4,6 x 10 ⁴	< 3,0	3,6 x 10 ² *
3	1,5 x 10 ³	< 3,0	< 3,0	< 3,0
4	7,5 x 10	4,6 x 10 ²	3,0	1,5 x 10 ²
5	9,3 x 10	1,1 x 10 ⁴	4,3 x 10	3,9 x 10 ² *
6	< 3,0	2,3 x 10 ³	< 3,0	2,3 x 10 ²
7	7,3	1,1 x 10 ³	< 3,0	< 3,0
8	7,3 x 10 ³	4,3 x 10	3,6 x 10 *	< 3,0
9	< 3,0	2,3 x 10	< 3,0	11,0
10	< 3,0	1,4 x 10 ³	< 3,0	9,1 x 10 ² *
11	9,1	2,4 x 10 ²	< 3,0	9,3 x 10 *
12	4,6 x 10 ³	4,3 x 10	1,5 x 10 ³	2,3 x 10
13	3,6	< 3,0	< 3,0	< 3,0
14	1,1 x 10 ⁵	2,4 x 10 ²	1,2 x 10 ⁴ *	4,3 x 10 *
15	7,5 x 10 ³	4,3 x 10	3,6 x 10 ²	2,3 x 10
Médias aritméticas e desvio padrão	1,6 x 10 ⁴ ± 3,8 x 10 ⁴	4,9 x 10 ³ ± 1,2 x 10 ⁴	4,0 x 10 ³ ± 1,2 x 10 ⁴	2,9 x 10 ² ± 5,6 x 10 ²

* Presença de *Escherichia coli* confirmada.

Como pode ser observado na Tabela 8, as populações de coliformes variaram de < 3,0 a 1,1x 10⁵ NMP.g⁻¹ para o grupo dos totais e de < 3,0 a 4,6 x 10⁴ NMP.g⁻¹ para os termotolerantes.

Na Tabela 8 verifica-se que as médias das populações de coliformes totais, nas amostras coletadas em restaurantes especializados e restaurantes não especializados foram, respectivamente, 1,6 x 10⁴ e 4,9 x 10³ NMP.g⁻¹. Para

coliformes termotolerantes as médias foram $4,0 \times 10^3$ e $2,9 \times 10^2$ NMP.g⁻¹, respectivamente, para o grupo de restaurantes especializados e não especializados.

Aplicado o teste t de Student aos valores das populações de coliformes totais, as diferenças entre médias não foram significativas do ponto de vista estatístico ($p > 0,05$). Isso significa que não houve diferença entre as populações de coliformes totais encontrados nos produtos adquiridos nos restaurantes especializados e não especializados. O mesmo resultado é obtido ao aplicar o teste t de Student aos valores das populações de coliformes termotolerantes. Sendo assim, também não existe diferença entre as populações de coliformes termotolerantes encontrados nos produtos adquiridos nos restaurantes especializados e não especializados.

A Tabela 9 refere-se à distribuição das amostras de sushi *in natura* segundo o exponencial de coliformes totais (NMP.g⁻¹).

Tabela 9. Distribuição das amostras de sushi *in natura* coletadas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa, segundo o exponencial de coliformes totais (NMP.g⁻¹). (Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto – SP, 2011 e 2012)

Exponencial de coliformes totais (NMP.g ⁻¹)	Número de amostras (%)		Total (%)
	Especializados	Não especializados	
Ausência (< 3,0)	3 (20,0)	2 (13,3)	5 (16,7)
< 10	3 (20,0)	0 (0,0)	3 (10,0)
10	3 (20,0)	4 (26,7)	7 (23,3)
10 ²	0 (0,0)	3 (20,0)	3 (10,0)
10 ³	4 (26,7)	3 (20,0)	7 (23,3)
10 ⁴	0 (0,0)	3 (20,0)	3 (10,0)
10 ⁵	2 (13,3)	0 (0,0)	2 (6,7)
Total de amostras	15 (100,0)	15 (100,0)	30 (100,0)

Na Tabela 9 é possível verificar que as maiores porcentagens das amostras com populações de coliformes totais encontram-se nos exponenciais de 10 NMP.g⁻¹ e 10³ NMP.g⁻¹, totalizando cada 23,3% das amostras analisadas.

A Tabela 10 refere-se à distribuição das amostras de sushi *in natura* segundo o exponencial de coliformes termotolerantes (NMP.g⁻¹).

Tabela 10. Distribuição das amostras de sushi *in natura* coletadas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa, segundo o exponencial de coliformes termotolerantes (NMP.g⁻¹). (Jaboticabal, Ribeirão e Preto Monte Alto – SP, 2011 e 2012)

Exponencial de coliformes termotolerantes (NMP.g ⁻¹)	Número de amostras (%)		Total (%)
	Especializados	Não especializados	
Ausência (< 3,0)	8 (53,3)	4 (26,7)	12 (40,0)
< 10	1 (6,7)	1 (6,7)	2 (6,7)
10	2 (13,3)	4 (26,7)	6 (20,0)
10 ²	1 (6,7)	5 (33,3)	6 (20,0) *
10 ³	1 (6,7)	1 (6,7)	2 (6,7) *
10 ⁴	2 (13,3)	0 (0,0)	2 (6,7) *
Total de amostras	15 (100,0)	15 (100,0)	30 (100,0)

* Amostras fora do padrão para Coliformes termotolerantes. Valor acima de 10² (NMP.g⁻¹) segundo RDC - nº12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

Na Tabela 10 verifica-se que 40,0% das amostras não apresentaram coliformes termotolerantes e que dois exponenciais, 10 NMP.g⁻¹ e 10² NMP.g⁻¹, apresentaram cada um, 20,0% das amostras analisadas. Também é possível verificar que 33,3% das amostras em que esses microrganismos foram quantificados apresentaram-se com valores acima de 10² NMP.g⁻¹, limite máximo previsto pela legislação vigente para alimentos similares (BRASIL, 2001). De acordo com a Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, essas amostras seriam consideradas inaceitáveis para o consumo.

Uma porcentagem menor que a encontrada nesse trabalho, foi verificada por Resende (2004), ao analisar sushis e sashimis na cidade de Brasília - DF, sendo que 25,0% das suas amostras apresentavam valores acima do permitido em relação à população de coliformes termotolerantes. Por outro lado, já na cidade de São Paulo - SP, Martins (2006) verificou que 50,0% das amostras de sushi e sashimi analisadas estavam fora da legislação para o mesmo grupo microrganismo.

A Tabela 11 apresenta as amostras em que foram identificadas *Escherichia coli*, as populações desse microrganismo e as populações de coliformes termotolerantes, distribuídas segundo o tipo de estabelecimento em que foram coletadas.

Tabela 11. Distribuição das amostras em que foram quantificadas *Escherichia coli* e coliformes termotolerantes, segundo o tipo de estabelecimento comercial. (Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto – SP, 2011 e 2012)

Número da amostra	População de coliformes termotolerantes	População <i>Escherichia coli</i> (Pop. NMP.g ⁻¹)
	Estabelecimentos especializados (Pop. NMP.g ⁻¹)	
1	4,6 x 10 ⁴ *	0,75 x 10
8	3,6 x 10	0,15 x 10
14	1,2 x 10 ⁴ *	7,5 x 10
Estabelecimentos não especializados (Pop. NMP.g⁻¹)		
1	2,1 x 10 ³ *	0,39 x 10
2	3,6 x 10 ² *	0,15 x 10
5	3,9 x 10 ² *	0,15 x 10
10	9,1 x 10 ² *	0,2 x 10
11	9,3 x 10	0,15 x 10
14	4,3 x 10	0,15 x 10

* Amostras fora do padrão para Coliformes termotolerantes. Valor acima de 10² NMP.g⁻¹ segundo RDC - nº12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

Na Tabela 11, é possível verificar que foi confirmada a presença de *E. coli* nas amostras 1, 8 e 14 do grupo de estabelecimentos especializados e nas amostras 1, 2, 5, 10, 11 e 14 do grupo de estabelecimentos não especializados, com populações variando de 0,15 x 10 a 7,5 x 10 NMP.g⁻¹ totalizando 9 amostras das 30 analisadas (30,0%). Não existe na legislação brasileira um limite para a população

de *E. coli*. Segundo Brasil (2001), a presença desse microrganismo, deverá ser relatada em laudo analítico quando constatado em um alimento.

A Tabela 12 apresenta, em resumo, as médias aritméticas e desvios padrão das populações de microrganismos heterotróficos mesófilos, heterotróficos psicrotrotócos, *Staphylococcus* sp., coliformes totais e coliformes termotolerantes, distribuídos pelo tipo de estabelecimento onde as amostras foram coletadas.

Tabela 12. Médias aritméticas e desvios padrão das populações de microrganismos heterotróficos mesófilos, heterotróficos psicrotrotócos, *Staphylococcus* sp., coliformes totais e coliformes termotolerantes, distribuídos pelo tipo de estabelecimentos onde as amostras foram coletadas. (Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto – SP, 2011 e 2012)

Microrganismos	Médias aritméticas das populações	
	Especializados	Não especializados
Heterotróficos mesófilos	$2,0 \times 10^6 \pm 4,6 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6 \pm 4,6 \times 10^6$
Heterotróficos psicrotrotócos	$9,4 \times 10^7 \pm 3,6 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7 \pm 3,3 \times 10^7$
<i>Staphylococcus</i> sp.	$3,5 \times 10^4 \pm 9,8 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4 \pm 6,7 \times 10^4$
Coliformes totais	$1,6 \times 10^4 \pm 3,8 \times 10^4$	$4,9 \times 10^3 \pm 1,2 \times 10^4$
Coliformes termotolerantes	$4,0 \times 10^3 \pm 1,2 \times 10^4$	$2,9 \times 10^2 \pm 5,6 \times 10^2$

Como já citado anteriormente, foi aplicado o teste t Student aos valores das populações dos microrganismos especificados na Tabela 12, e do ponto de vista estatístico, não houve diferenças significativas entre médias dessas populações ($p > 0,05$).

No início desse trabalho, esperava-se que existissem diferenças significativas entre os resultados obtidos nos dois grupos de restaurantes estudados. Restaurantes especializados trabalham somente com a culinária japonesa, sendo que muitos fazem propaganda destacando a higiene durante o preparo dos sushis, bem como a eficiência, qualidade, tradição e perícia de seus "sushimen". Esses funcionários, obrigatoriamente, recebem capacitação em cursos aprendendo a preparar um sushi de boa qualidade. Já os restaurantes não especializados, trabalham com vários tipos de culinária necessitando de bons cozinheiros mas que

não recebem treinamento para realização de boas práticas sanitárias durante o seu serviço.

Entretanto, os resultados obtidos ao final desse estudo, mostraram que não existiram diferenças na qualidade dos sushis oferecido ao consumidor pelos dois tipos de restaurantes. Apesar de todas as amostras analisadas apresentarem um aspecto visual excelente quando coletadas, as altas quantidades de microrganismos heterotróficos mesófilos, heterotróficos psicrotróficos, e populações relativamente altas de coliformes totais e termotolerantes, são reflexos de condições higiênicas e sanitárias inadequadas durante a preparação, manuseio, ou até mesmo matéria prima de baixa qualidade utilizada pelos estabelecimentos comerciais. Esse diagnóstico demonstra a deficiência dos órgãos governamentais de fiscalização que deveriam estar zelando pela qualidade desses produtos, bem como a falta de preparo e capacitação dos profissionais da área alimentícia.

Outro fator de destaque encontrado nesse trabalho foi a presença de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Esses microrganismos são importantes para a saúde pública, pois em condições ideais para sua multiplicação, podem causar enfermidades severas, podendo atingir grande parte de consumidores.

Era previsto também verificar a presença do *Vibrio parahaemolyticus* e microrganismos do gênero *Salmonella*. As tentativas de isolamento da *Salmonella* spp. foram realizadas até as etapas de plaqueamento seletivo em ágar verde-brilhante e ágar MacConkey. Como não houve desenvolvimento de colônias sugestivas do gênero em questão, as etapas subsequentes não foram realizadas. Sendo assim, todas as amostras analisadas mantiveram-se dentro do padrão estabelecido, que define ausência de *Salmonella* spp. em 25,0 g do alimento.

Com relação ao *Vibrio parahaemolyticus*, as técnicas de isolamento foram realizadas até a etapa de plaqueamento em ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS). Entretanto, também não ocorreu desenvolvimento de colônias sugestivas do microrganismo, inviabilizando a continuação da técnica. Sendo assim, todas as amostras analisadas mantiveram-se dentro do padrão estabelecido, que define um limite máximo de 10^3 NMP.g⁻¹ para *V. parahaemolyticus* em pratos a base de peixe cru.

Resultados semelhantes foram encontrados por Vallandro et al. (2011), que avaliaram 108 amostras de sashimis a base de salmão de restaurantes especializados em comida japonesa em Fortaleza - CE, verificando a ausência de *Salmonella* spp. e *Vibrio parahaemolyticus* em todas as amostras. Martins (2006) avaliando 20 amostras de preparações a base de peixe cru (sushi e sashimi) comercializadas em São Paulo, também não detectou a presença desses microrganismos.

Vallandro (2010), ao final do seu trabalho, relata que a origem da contaminação mais provável para *Salmonella* spp. e *Vibrio parahaemolyticus* em sashimis a base de salmão (*Salmo salar*), seriam os locais de criação e/ou captura do pescado. O fato da matéria-prima utilizada pelos restaurantes ter procedência conhecida e serem de estabelecimentos importadores com fiscalização, provavelmente contribuiu para ausência desses microrganismos. Como todas as amostras analisadas neste estudo eram obrigatoriamente constituídas de salmão (*Salmo salar*), a mesma conclusão pode ser adotada para explicar o fato de não ter-se encontrado estes agentes patogênicos. É importante ressaltar que o sushi, diferentemente do sashimi, é um alimento composto por vários ingredientes. Sendo assim, a contaminação por *Salmonella* spp. poderia ocorrer através de ovos, molhos, queijos, legumes e outras variedades de componentes utilizados para fazer os sushis.

Em relação ao *Vibrio parahaemolyticus*, Vallandro (2010), apresenta uma hipótese de que a ausência desse microrganismo em sashimis pode estar relacionada ao fato do salmão (*Salmo salar*) consumido no Brasil, ser criado em águas frias, principalmente no Chile. Segundo Forsythe (2002), citado por Vallandro (2010), é provável que essa característica contribua para baixa ocorrência da bactéria ou presença em baixo número no pescado, pois *V. parahaemolyticus* está presente, normalmente, em quantidades superiores a 10^3 UFC.g⁻¹ em peixes e frutos do mar procedentes de águas mornas. Além disso, o salmão consumido é transportado congelado para o Brasil, fator que também é adverso à sobrevivência da bactéria, segundo Cook e Ruple (1992), citado por Vallandro (2010).

A Tabela 13 apresenta um resumo das amostras fora do padrão estabelecido para estafilococos coagulase positivo e coliformes termotolerantes, distribuídos de acordo com o tipo de estabelecimento onde as amostras foram adquiridas.

Tabela 13. Amostras fora do padrão para estafilococos coagulase positivo e coliformes termotolerantes, segundo os parâmetros estabelecidos pela RDC - nº12, de 2 de janeiro de 2001 para alimentos similares, distribuídos pelo tipo de estabelecimento onde foram coletadas.

Microrganismos	Amostras fora do padrão		Total (%)
	Especializados	Não especializados	
Estafilococos coagulase positivo *	1 (A1)	3 (A1, A6 e A12)	4 (13,3)
Coliformes termotolerantes **	4 (A1, A12, A14 e A15)	6 (A1, A2, A4, A5, A6 e A10)	10 (33,3)
Amostras fora do padrão para os 2 microrganismos	1 (A1)	2 (A1 e A12)	3 (10,0)
Total de amostras fora do padrão	4 (A1, A12, A14 e A15)	7 (A1, A2, A4, A5, A6, A10 e A12)	11 (36,6)

* Valor acima de $5,0 \times 10^3$ UFC.g⁻¹. ** Valor acima de 10^2 NMP.g⁻¹.

Foi aplicado o teste exato de Fisher entre os grupos de estabelecimentos especializados e não especializados, comparando as amostras dentro e fora do padrão para estafilococos coagulase positivo e coliformes termotorantes. Como resultados, não existiram diferenças significativas do ponto de vista estatístico entre os grupos de estabelecimentos ($p > 0,05$), portanto não houve diferenças nas frequências encontradas entre as amostras dentro do padrão e fora do padrão, para os dois tipos de estabelecimentos em relação aos microrganismos em questão.

Ao final desse trabalho, verificou-se que o total de amostras fora do padrão foram 11 (36,6%). Foi aplicado o teste de qui-quadrado entre os grupos de estabelecimentos especializados e não especializados, comparando as amostras dentro e fora do padrão. Como resultado, não existiu diferença significativa do ponto de vista estatístico entre os grupos de estabelecimentos ($\chi^2 < \chi^2_c = 0,05$), portanto as frequências encontradas entre as amostras dentro do padrão e fora do padrão para os 2 tipos de restaurantes são iguais.

6. CONCLUSÕES

Com a expansão do consumo do sushi, aliado a preocupação com qualidade dos alimentos e riscos de contaminação por agentes veiculadores de doenças de origem alimentar, é importante salientar a importância desse estudo, bem como as conclusões que se seguem:

- Microrganismos heterotróficos mesófilos e psicrotróficos foram detectados em 100,0% das amostras, com populações de até $1,7 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ para o primeiro grupo e de até $1,4 \times 10^9$ UFC.g⁻¹ para o segundo;

- Não existe na legislação brasileira um limite estabelecido para microrganismos heterotróficos mesófilos e psicrotróficos, entretanto comparando com parâmetros da literatura, 73,3% das amostras estariam insatisfatórias para o consumo em decorrência da elevada população de mesófilos e 13,3% em função dos psicrotróficos;

- Segundo a legislação brasileira para alimentos similares crus, 33,3% das amostras analisadas seriam inaceitáveis para o consumo, pois apresentaram populações de coliformes termotolerantes acima do limite estabelecido;

- A presença *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em número representativo de amostras caracterizam o sushi como um alimento com potencial para a veiculação desses agentes de enfermidades de origem alimentar;

- Muito embora tenha sido encontrado microrganismos indicadores de contaminação fecal, *Salmonella* spp. e *Vibrio parahaemolyticus* não foram isolados neste estudo;

- Não existiu diferença significativa na qualidade microbiológica dos sushis oferecidos para o consumidor em estabelecimentos especializados e não especializados.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por fim, os dados deste trabalho podem contribuir com subsídios técnicos para a comunidade acadêmica e de saúde pública, tendo em vista que existem poucos trabalhos sobre o assunto em nosso meio. Quanto a servir de parâmetros para a criação de uma legislação brasileira referente a padrões microbiológicos específicos para a comida japonesa, os resultados, bem como conclusões desse estudo, são importantes e representam a atual situação da qualidade higiênica e sanitária desses alimentos oferecidos ao consumidor. Entretanto, para o estabelecimento de um limite ideal, que ofereça segurança aos consumidores de comida japonesa, sugere-se a realização de novos estudos, mais abrangentes no aspecto regional ou estadual, cujos resultados, somados aos dados deste trabalho, possam definir uma base para o estabelecimento de legislação específica.

8. REFERÊNCIAS

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

ALBUQUERQUE, W. F.; BARRETO, N. S. E.; SILVA, A. I. M.; VIEIRA, R. H. S. F. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* e estafilococos coagulase positivo, em sushis comercializados em alguns estabelecimentos de Fortaleza – CE. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 146, p. 58-61, 2006.

ALMEIDA-FILHO, E. S.; SIGARINI, E. S.; OLIVEIRA, C.; DELMONDES, J. N.; STELATTO, E. C.; ALDOCÍRIO, A. J. Características microbiológicas de "pintado" (*pseudoplatystona Fasciatum*) comercializado em supermercados e feira livre, no município de Cuiabá - MT. **Revista Higiene Alimentar**, Mirandópolis, v. 16, n. 99, p. 84 -88, 2002.

APHA. American Public Health Association. Committee on Microbiological for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington, 2001. 676 p.

AYULO, A. M. R.; MACHADO, R. A.; SCUSSEL, V. M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 24, n. 1-2, p. 171-178, 1994.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução – RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 20 out. 2012.

BUTT, A. A.; ALDRIDGE, K. E.; SANDERS, C. V. Infections related to the ingestion of seafood. Part I: viral and bacterial infections. **The Lancet Infectious Diseases** Baltimore, v. 4, n. 4, p. 201-212, 2004.

CARDOSO, N. L. C.; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; SERAFINI, A. B. Avaliação microbiológica de carne de peixe comercializada em supermercados da cidade de Goiânia, GO. **Revista Higiene Alimentar**, Mirandópolis, v. 17, n. 109, p. 81-87, 2003.

CARVALHO. E. P. **Microbiologia de alimentos**.Lavras: UFLA/FAEP,1999. p. 76.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. **Salmonella**. 2011. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella>>. Acesso em: 23 out. 2012a.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. **Vibrio parahaemolyticus**. 2011. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/vibriop/#learn>>. Acesso em: 23 out. 2012b.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. **EPI INFO™ 7.1.1.14**. StatCalc algorithms and formulas provided by OpenEpi.com. Disponível em: <<http://wwwn.cdc.gov/epiinfo/7/index.htm>>. Acesso em 27 maio 2013.

CHIOU, C. S.; HSU, S. Y.; CHIU, S. I.; WANG, T. K.; CHAO, C. S. *Vibrio Parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 12, p. 4621-4625, 2000.

FARIAS, H. **Qualidade higiênico-sanitária na cadeia produtiva de ostras, *Crassostrea sp.*, cultivadas na Baía de Guaratuba, PR, Brasil**. 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, área de Concentração e Produção) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

FONTES, M. C.; ESTEVES, A.; SARAIAVA, C.; VIEIRA-PINTO, M.; MARTINS C. Estado de frescor e qualidade higiênica do pescado vendido numa cidade do interior de Portugal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 5, p. 1308-1315, 2007.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

GILBERT, R. J.; LOUVOIS, J.; DONOVAN, T.; LITTLE, C.; NYE, K.; RIBEIRO, C. D.; RICHARDS, J.; ROBERTS, D.; BOLTON, F. J. Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods samples at the point of sale. **Communicable Disease Public Health**, London, v. 3, n. 3, p. 163-167, 2000.

HILUY, D. J.; PINHEIRO, H. C. G.; MOURÃO, A. F.; MACEDO, E. P.; CARVALHO, M. L. M. Avaliação da qualidade dos produtos pesqueiros no estado do Ceará. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 10, n. 45, p. 37, 1996.

HIRSH, D. J. *Salmonella*. In: HIRSH, D. J.; ZEE, Y. C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap. 10, p. 69-73.

ICMSF. International Commission on Microbiological Standards for Foods. Microrganismos de los alimentos: metodos de muestro. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Para análisis microbiológicos**: principios y aplicaciones específicas. Zaragoza : Acribia, 1981. cap. 8, p. 91-103.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712 p.

KIM, N. H.; YUN, A. R.; RHEE, M. S. Prevalence and classification of toxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from refrigerated ready-to-eat foods (sushi, kimbab and California rolls) in Korea. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 111, n. 6, p. 1456–1464, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05168.x>>.

LEITÃO, M. F. F.; ARIMA, H. K. *Vibrio parahaemolyticus* no ambiente marinho do Estado de São Paulo. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 6, n. 1, p. 149-166, 1975.

LIRA, G. M.; PEREIRA, W. D.; ATHAYDE A. H. Avaliação da qualidade de peixes comercializados na cidade de Maceió-AL. **Revista de Higiene Alimentar**, Mirandópolis, v. 15, p. 67-74, 2001.

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

LOZANO-LEON, A.; TORRES, J.; OSORIO, C. R.; MARTINEZ-URTAZA, J. Identification of tdh-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. **FEMS Microbiology Letters**, Chichester, v. 226, n. 2, p. 281–284, 2003.

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

MALAVOTA, L. C. M. **Avaliação dos pontos críticos no processamento de “sashimis” em restaurantes**: análises bacteriológicas e pesquisa de sensibilidade a antimicrobianos. 2008. 117 f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niteroi, RJ, 2008.

MARTINS, F. O. **Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de preparações (sushi e sashimi) a base de pescado cru servidos em bufês na cidade de São Paulo**. 2006. 121 f. Dissertação (Mestre em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MURATORI, M. C. S.; COSTA, A. P. R.; VIANA, C. M.; PODESTA JÚNIOR, R. L. Qualidade sanitária do pescado “in natura”. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 116-117, p. 50-54, 2004.

NESPOLO; N. M. **Características microbiológicas de salmão (*Salmo salar*) comercializado em algumas cidades da região nordeste do estado de São Paulo**. 2009. 67 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Área de Concentração Medicina Veterinária preventiva), Jaboticabal – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Jaboticabal, 2009.

PATROCÍNIO, I. D. R. A segurança alimentar no consumo de pescado cru com valência para a produção de sushi. 2009. 129 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2009.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. **Microbiologia**. São Paulo: MacGraw-Hill do Brasil, 1981. 2 v.

PEREIRA, C. S.; POSSAS, C. A.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. Características de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de mexilhões (*Perna perna*) comercializados em Niterói, Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Belo Horizonte, v. 40, n. 1, p. 56-59, 2007.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMUHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2002 (nº 46), to the Kauffmann-Whitte scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 155, n. 7, p. 568-570, 2004.

REINBOLD, G.W. Indicator organisms in dairy products. **Food Technology**, Chicago, v. 37, n. 6, p. 111-113, 1983.

RESENDE, A. **Análise microbiológica, de metais contaminantes (Hg e Pb), e metais nutricionais (Zn e Cu) em sushis e sashimis comercializados em restaurantes de Brasília**. 2004. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

RODRIGUES, K. L.; MOREIRA, A. N.; ALMEIDA, A. T. S.; CHIOCHETTA, D.; RODRIGUES, M. J.; BROD, C. S.; CARVALHAVAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1 p. 297-299, 2004.

RODRIGUES L. A. P. **Avaliação do risco microbiológico por *Vibrio parahaemolyticus* em ostras nativas (*Crassostrea rhizophorae*) cultivadas na Baía de Todos os Santos**. 2009. 174 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.

SAKAZAKI, R.; IWANAMI, S.; FUKUMI, H. Studies on the enteropathogenic facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. I Morphological, cultural and biochemical properties and its taxonomical position. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, Tokyo, v. 16, p. 161-188, 1963.

SANTOS, L. S.; ASSIS M. O.; ARGÔLO, S. V.; F AZEVÊDO, P. P. N.; OLIVEIRA, P. N.; VIEIRA, N. C.; GUIMARÃES, A. G.; CARDOSO, R. C. V. Avaliação da qualidade microbiológica de temakis grelhados comercializados em restaurantes de Salvador - BA. **Nutrire**: revista da sociedade brasileira de alimentação e nutrição, São Paulo, v. 36, supl., p. 17, 2011.

SANTOS, A. A.; SIMÕES, G. T. N.; CRUZ, M. M.; FERREIRA, N. S. S.; LIMA, R. T. C.; TUNON, G. I. L. Avaliação da qualidade microbiológica de sushi comercializado em restaurantes de Aracaju, Sergipe. **Scientia Plena**, v. 8, n. 3, 2012. Disponível em: <<http://www.scientiaplenu.org.br/ojs/index.php/sp/article/viewFile/894/456>>. Acesso em: 20 nov. 2012.

SANTOS, E. S.; CARVALHO, E. P.; ABREU, L. R. Psicotróficos: consequências de sua presença em leites e queijos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 33, n.2, p. 129-138, 1999.

SAS INSTITUTE. **User's guide**: statistics. Cary, 2005.

SCAFURO, C. São Paulo tem mais restaurantes japoneses do que churrascarias. **Jornal da Baixada**, 2011. Disponível em: <<http://www.jornaldabaixada.com.br/?p=1203>>. Acesso em: 20 out. 2012.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual higiênico sanitário de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Varela, 2001. p. 477.

VALLANDRO, M. J. **Avaliação da qualidade microbiológica de sashimis a base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa na cidade de Porto Alegre - RS.** 2010. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias na área de Bacteriologia) - Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

VALLANDRO, M. J.; CAMPOS, T.; PAIM, D.; CARDOSO, M.; KINDLEIN, L. Avaliação da qualidade microbiológica de sashimis à base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 144-150, 2011.

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. **Foodborne pathogens: an illustrated text.** London: Mosby Year Book, 1991. 547 p.

VIEIRA, R. H. S. F.; RODRIGUES D. P.; BARRETO, N. S. E.; SOUZA, O. V.; TORRES, R. C. O.; RIBEIRO, R. V.; SAKER-SAMPAIO, S.; NASCIMENTO, S. M. M.; PEREIRA DA COSTA, F. A.; MADEIRA, Z. R. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática.** São Paulo: Livraria Varela, 2004a. v. 1.

VIEIRA, R. H. S. F.; LIMA, E. A.; SOUSA, D. B. R.; REIS, E .F.; COSTA, R. G.; RODRIGUES, D. P. *Vibrio* spp. and *Salmonella* spp., presence and susceptibility in crabs *Ucides cordatus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 179-182, 2004b.

YOSHINO, M. **Sushi: the delicate flavour of Japan.** Tokyo: Japan Publications Trading, 1997.