

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

CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

GOUSILIN LEANDRA ROCHA DA SILVA

**Avaliação microbiológica de alimentos da culinária japonesa,
comercializadas em Botucatu, SP**

BOTUCATU

2022

GOUSILIN LEANDRA ROCHA DA SILVA

**Avaliação microbiológica de alimentos da culinária japonesa,
comercializadas em Botucatu, SP**

Trabalho de conclusão do curso de Ciências Biomédicas apresentado ao Instituto de Bociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para a obtenção de título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

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

BOTUCATU

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Silva, Gousilin Leandra Rocha da.

Avaliação microbiológica de alimentos da culinária japonesa, comercializadas em Botucatu, SP / Gousilin Leandra Rocha da Silva. - Botucatu, 2022

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Vera Lúcia Mores Rall

Capes: 21202001

1. Culinária japonesa. 2. *Salmonella*. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. Biofilmes. 5. Alimentos - Microbiologia. 6. *Vibrio parahaemolyticus*.

Palavras-chave: Biofilme; Culinária japonesa; *S. aureus*; *Salmonella*; *V. parahaemolyticus*.

GOUSILIN LEANDRA ROCHA DA SILVA

**Avaliação microbiológica de alimentos da culinária japonesa,
comercializadas em Botucatu, SP**

Trabalho de conclusão do curso de Ciências Biomédicas apresentado ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para a obtenção de título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Banca Examinadora:

Profª Drª Vera Lúcia Mores Rall

Profº Drº Ary Fernandes Júnior

Botucatu, __ de janeiro de 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Instituto de Biociências de Botucatu e todos os colaboradores que contribuíram para minha formação acadêmica, desde a graduação até a iniciação científica.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto em modalidade Iniciação Científica, processo N° 2019/10145-2.

À minha orientadora, Prof^a Dr^aa Vera Lúcia Mores Rall, que me acolheu desde quando dei início à iniciação científica me dando todo o suporte e conhecimento necessário para a realização da mesma, para a realização do meu estágio obrigatório e meu ingresso na Pós-Graduação.

Agradeço à todos que de alguma forma estiveram presentes durante meu tempo no Laboratório de Microbiologia de Alimentos. Em especial, agradeço à Bruna e a Erika que sempre me ensinaram e tiraram todas as dúvidas não importava o horário. Esse laboratório de certa forma se tornou uma segunda casa e só fez aumentar meu amor pela microbiologia.

Agradeço às minhas companheiras de graduação, Marina, Larissa e Júlia, que desde o primeiro ano vivenciaram muitos momentos junto a mim, sejam eles bons ou ruins. Agradeço por todas as noites de estudo, todas as conversas no departamento e todas as risadas que dêmos juntas. Agradeço também à todas amigas ao longo desses anos, sejam elas as criadas em Botucatu ou as que trouxe da minha cidade natal.

Agradeço à minha família por todo apoio. Esse agradecimento vai principalmente aos meus pais, Ana, Fernando e Alberto, e minha avó, Marina, que escutaram todos os meus lamentos durante esse tempo e não me deixaram desistir.

Agradeço ainda à pessoas muito especiais que entraram na minha vida no fim da graduação, mas que fizeram dele significativo.

RESUMO

A busca por um estilo de vida saudável vem aumentando e atingindo cada vez mais indivíduos que procuram alimentos que se adequem a esse quesito, como os da culinária japonesa. Apesar dos pratos serem considerados benéficos a saúde, a característica altamente perecível, pela presença do peixe cru, aliado a um preparo com elevada manipulação, aumenta os riscos de contaminação. Assim, considerando os riscos de contaminação e a escassez de informações sobre a qualidade higiênico-sanitária de alimentos da culinária japonesa na cidade de Botucatu, o objetivo foi verificar a qualidade microbiológica de alimentos da culinária japonesa, de acordo com os padrões estabelecidos pela RDC N° 12/2001 (ANVISA), com a pesquisa de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* coagulase positiva (ECP), *Salmonella* sp e *Vibrio parahaemolyticus*, além da determinação de coliformes termotolerantes (CTo). Apesar de não fazer parte dessa legislação, os estafilococos coagulase negativa (ECN) também foram pesquisados. Os isolados de ECP foram identificados até a espécie *S. aureus* por PCR, além da pesquisa da presença dos genes que codificam para a produção de biofilme e de algumas enterotoxinas (SEA- SEI). Além disso, foram testadas a produção *in vitro* de biofilme e das enterotoxinas clássicas (SEA-SED). Entre as 70 amostras analisadas, de 14 restaurantes de Botucatu/SP, 50 (71,4%) apresentaram CTo, mas somente 27 (38,6%) estavam acima dos limites estabelecidos. *Salmonella* sp, *V. parahaemolyticus* e *B. cereus* não foram detectados. *S. aureus* foi observado em 5 (7,1%) amostras. Em relação aos genes que codificam as enterotoxinas, o gene *seg* e *sei* foram os mais frequentes, estando presentes simultaneamente em 2 (40%) isolados, o *seh* foi observado também em 2 (40%) isolados e os genes das enterotoxinas clássicas não foram detectados. Todos as cepas de *S. aureus* foram produtores moderados de biofilme. O gene *icaD* esteve presente em todos os isolados e o *icaA* em 40%. Mesmo com a ausência de bactérias causadoras de diarreias como *Salmonella* sp, *V. parahaemolyticus* e *B. cereus*, os alimentos da culinária japonesa comercializados em Botucatu/SP não podem ser considerados seguros para o consumo, devido à presença de CTo, que indicam contaminação de origem fecal. Além disso, ocorreu a presença de *S. aureus*, bactéria com potencial enterotoxigênico, e de ECN que, por fazerem parte da microbiota da pele de humanos, demonstram falta de higiene por parte dos manipuladores.

Palavras-chave: culinária japonesa, *S. aureus*, *Salmonella*, *V. parahaemolyticus*, biofilme, enterotoxinas, RPLA.

ABSTRACT

The search for a healthy lifestyle has been increasing and reaching more and more individuals looking for foods that suit this aspect, such as Japanese cuisine. Although the dishes are considered beneficial to health, the highly perishable characteristic, due to the presence of raw fish, combined with a preparation with high handling, increases the risks of contamination. Thus, considering the risks of contamination and the scarcity of information on the hygienic-sanitary quality of Japanese cuisine foods in the city of Botucatu, the objective was to verify the microbiological quality of Japanese cuisine foods, according to the standards established by RDC No. 12/2001 (ANVISA), with the investigation of *Bacillus cereus*, coagulase-positive *Staphylococcus* (CPS), *Salmonella* sp and *Vibrio parahaemolyticus*, in addition to the determination of thermotolerant coliforms (CTo). Despite not being part of this legislation, coagulas-negative staphylococci (CNS) were also investigated. The CPS isolates were identified up to the species *S. aureus* by PCR, in addition to the investigation of the presence of genes coding for the production of biofilm and some enterotoxins (SEA-SEI). In addition, the in vitro production of biofilm and classical enterotoxins (SEA-SED) were tested. Among the 70 samples analyzed, from 14 restaurants in Botucatu/SP, 50 (71.4%) presented CTo, but only 27 (38.6%) were above the established limits. *Salmonella* sp, *V. parahaemolyticus* and *B. cereus* were not detected. *S. aureus* was observed in 5 (7.1%) samples. Regarding the genes encoding enterotoxins, the *seg* and *sei* gene were the most frequent, being present simultaneously in 2 (40%) isolates, *seh* was also observed in 2 (40%) isolates and the classical enterotoxin genes were not detected. All *S. aureus* strains were moderate biofilm producers. The *icaD* gene was present in all isolates and *icaA* in 40%. Even with the absence of diarrhea-causing bacteria such as *Salmonella* sp, *V. parahaemolyticus* and *B. cereus*, Japanese food sold in Botucatu/SP cannot be considered safe for consumption, due to the presence of CTo, which indicates contamination of faecal origin. In addition, there was the presence of *S. aureus*, a bacterium with enterotoxigenic potential, and of CNS which, as they are part of the human skin microbiota, demonstrate a lack of hygiene on the part of the handlers.

Keywords: Japanese cuisine, *S. aureus*, *Salmonella*, *V. parahaemolyticus*, biofilm, enterotoxins, RPLA.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Aquisição e coleta das amostras	14
3.2. Análises microbiológicas	14
3.2.1. Identificação de <i>Staphylococcus aureus</i>	14
3.2.2. Detecção da presença de <i>Salmonella</i>	19
3.2.3. Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes	20
3.2.4. Enumeração de bactérias do grupo <i>Bacillus cereus</i>	21
3.2.5. Número Mais Provável de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	21
3.3. Pesquisa de fatores de virulência (produção de biofilme e de enterotoxinas) nos isolados de estafilococos coagulase negativa e de <i>S. aureus</i>	21
3.4. Pesquisa de enterotoxinas clássicas de <i>S. aureus</i>	23
3.5. Produção de biofilme por <i>S. aureus</i> , em microplaca de poliestireno	23
3.6. Teste de disco-difusão	24
4. RESULTADOS	24
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÃO	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUÇÃO

A diversidade cultural existente no Brasil é notória, pela chegada de muitos imigrantes no país desde o século passado. Os japoneses começaram a imigração em 1908, com um aumento de 82,3% no período de 1920 a 1970, (IBGE, 2014), levando à expansão da cultura japonesa no país, com influência direta na gastronomia (SILVA, 2015).

Atualmente, é grande a procura por alimentos considerados saudáveis e a culinária japonesa está incluída nessa categoria (SANTOS et al., 2012). Conseqüentemente, a abertura desse tipo de restaurante cresceu 700% nos últimos 10 anos, de acordo com a Associação Brasileira de Culinária Japonesa – ABCJ (2014) (SILVA, 2015). Esse fato se dá pelo alto valor nutritivo que a carne de peixe oferece, pois além de ser uma formidável fonte de proteína animal, contém baixo teor de gordura e ácidos graxos poli-insaturados, importantes para o funcionamento do organismo humano (SANTOS; QUADROS, 2017). Ademais, esse tipo de carne possui também vitaminas lipossolúveis A e D em abundância, assim como minerais, cálcio, cobre, ferro, selênio, fósforo, e iodo, no caso de peixes de água salgada (MONTANARI et al., 2015).

Ainda que os benéficos consigam atrair cada vez mais consumidores que apreciam esses alimentos, o fato de vários pratos típicos terem o peixe cru como base, sendo produtos demasiadamente perecíveis, provoca um alerta na saúde pública (SANTOS et al., 2012). Muitos pratos também não contam com um tratamento térmico prévio visando a redução de micro-organismos, o que aumenta os riscos para o consumidor (LIANG et al., 2016).

A ingestão de alimentos contaminados é crescente em diversos países na atualidade, sendo responsável por até 70% dos casos de doenças diarreicas em países em desenvolvimento (MENGIST; MENGISTU; RETA, 2018). O transporte e armazenamento da matéria prima desses produtos são pontos de perigo de contaminação e, mesmo que sejam adequados, a manipulação durante o preparo pode ser uma fonte significativa de contaminação (SANTOS et al., 2012). Por isso, a higiene básica dos manipuladores é imprescindível para prevenir possíveis transmissões de patógenos via fecal-oral para o consumidor (MENGIST; MENGISTU; RETA, 2018). É válido também ressaltar que até mesmo micro-organismos presentes naturalmente na microbiota dos peixes podem provocar distúrbios no homem (SANTOS et al., 2012). O risco de

contaminação cruzada a partir dos vegetais utilizados nos pratos é também existente (MONTANARI et al., 2015).

Ao ingerir alimentos contaminados, os indivíduos são expostos às doenças transmitidas por alimentos (DTA), uma síndrome que pode apresentar, principalmente, náuseas, diarreias, vômitos, podendo ou não causar febre. De acordo com o patógeno que contamina o alimento (bactérias, vírus, toxinas, parasitas), pode haver infecção e sintomas que abrangem outros órgãos e sistemas como meninges, rins, fígado, sistema nervoso central e outros. (SANTOS; QUADROS, 2017).

As bactérias patogênicas mais comumente encontradas em pesquisas referentes à comida tradicional japonesa são *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Escherichia coli*. A presença do arroz cozido em muitos dos pratos inclusos nessa cultura explica a possível presença também de *Bacillus cereus*.

A *Salmonella spp.* é um bacilo Gram negativo, pertencente à família Enterobacteriaceae. Essa bactéria não forma esporos, é oxidase negativa e catalase positiva, além de anaeróbia facultativa, fermenta glicose e reduz o nitrato (SATO, 2013). O auxílio de flagelos peritríquios proporciona a mobilidade daquelas que o possuem, ressaltando a existência de dois sorovares imóveis (SATO, 2013). É considerada como uma das bactérias patogênicas mais importantes que afetam a saúde do homem, provocando diarreia, febre e cólicas abdominais após 12 a 72 horas do consumo do alimento contaminado (HUANG et al., 2018a). Anualmente, a população mundial apresenta 93,8 milhões de casos, alcançando cerca de 155 mil mortes pela infecção que ocorre, principalmente, pelo consumo de ovos crus e carne crua de aves (ZENG et al., 2018). Além desses, foram comprovadas outras matrizes, como vegetais, frutas, cereais, frutos do mar, produtos lácteos e de carne (HUANG et al., 2018), os quais podem ter tido contato com fezes animal (esterco) para que ocorresse a contaminação (DOS SANTOS et al., 2019).

O *Staphylococcus aureus* é caracterizado como cocos em dispostos em “cachos”, Gram positivo, imóvel, anaeróbio facultativo, de catalase positiva e oxidase negativa. Além de produzir hemolisinas, coagulases, nucleases e lipases, produz enterotoxinas (SATO, 2013). Cerca de 23 enterotoxinas estafilocócicas (SE's) foram identificadas e essas são habitualmente relacionadas à intoxicação alimentar, que ocorre pela ingestão de alimentos contaminados com a toxina, como leite, queijo, sucos, presunto, refeições cozidas e outras (SOSPEDRA; SORIANO; MAÑES, 2013). A principal enterotoxina

relacionada com os casos de doença estafilocócica é a do tipo A (SEA), causando 80% dos casos relatados,

As SE's apresentam alta resistência ao calor, à acidez e à inativação por enzimas e proteases; sendo consideradas superantígenos, estimulando grande quantidade de células T (SOSPEDRA; SORIANO; MAÑES, 2013). Essa resistência (100°C/30 minutos) permite que permaneçam estáveis mesmo após processos de cocção capazes de eliminar as bactérias vegetativas, e quando ingeridas, mesmo em baixas doses, provocam a intoxicação alimentar estafilocócica (SFP, Staphylococcal Food Poisoning) (SOSPEDRA; SORIANO; MAÑES, 2013). Os alimentos mais comumente envolvidos nos casos de intoxicações são o leite e seus derivados, carnes, produtos crus e manipulados e saladas (FETSCH et al., 2014; NORMANNO et al., 2007). Os sintomas, como náuseas, vômitos, diarreias, cólicas abdominais e prostração aguda, afetam o indivíduo após 2 a 6 horas do consumo (NORMANNO et al., 2007; SOSPEDRA; SORIANO; MAÑES, 2013) e costumam desaparecer entre 24 a 48 horas, sendo casos de morte considerados raros (NORMANNO et al., 2007).

É essencial detectar a fonte de contaminação para que a mesma seja solucionada, tendo em vista que em muitos casos, a higiene na manipulação está envolvida. Isso ocorre devido a característica do *S. aureus* ter relação comensal com o ser humano, habitando a pele e as mucosas de cerca de 20-30% da população (FETSCH et al., 2014). Assim, a inserção dessa bactéria nos alimentos é simples e derivada de maus hábitos higiênicos.

O biofilme produzido por *S. aureus* representa um importante fator de permanência da bactéria no ambiente (Otto, 2008). É constituído por bactérias aderidas às superfícies e envolvidas por uma matriz polimérica chamada de adenosinopolissacarídica intercelular (PIA) ou N-acetilglicosamina polimérica (PNAG) (Mack et al., 2007). Uma vez estabelecido, os micro-organismos que compõe o biofilme podem se tornar mais tolerantes a fatores ambientais e a desinfetantes (Mahmoud e O'toole, 2001). Foi comprovada a capacidade do biofilme de atuar como fonte de contaminação microbiana, podendo reduzir a qualidade do alimento e colocando em risco a saúde dos consumidores (Donlan, 2002).

A bactéria *Vibrio parahaemolyticus* tem a forma de bastão ou vírgula, sendo Gram negativa, oxidase positiva, anaeróbia facultativa e fermentadora de glicose sem a produção de gás. A presença de um flagelo polar simples confere sua mobilidade (SATO, 2013). Tendo como habitat frequente os ambientes marinho e estuarino de regiões

tropicais e temperadas, contamina peixes e frutos do mar (CHEN et al., 2019; HUANG et al., 2018b; PARK et al., 2018; SHEN et al., 2019). Esses alimentos, quando consumidos crus ou mal cozidos, podem provocar diarreia, ocasionalmente sanguinolenta, cefaleia, náuseas, febre, vômitos e outros (CHEN et al., 2019; HUANG et al., 2018b; PARK et al., 2018; SHEN et al., 2019). Apenas 1% dos casos de gastroenterite resulta em morte, sendo imunodeprimidos susceptíveis à septicemia ou outras doenças graves por *V. parahaemolyticus* (CHEN et al., 2019; HUANG et al., 2018b; PARK et al., 2018; SHEN et al., 2019).

A *Escherichia coli*, pertencente à família Enterobacteriaceae, faz parte do grupo dos coliformes, que ainda inclui *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (BATT, 2014). Os coliformes são bastonetes Gram negativos, oxidase negativa, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos (EDEN, 2014). Esse conjunto de bactérias é comumente utilizado como indicadores higiênicos e higiênico-sanitários, tendo em vista que compõem cerca de 10% da microbiota intestinal (EDEN, 2014; PATEL et al., 2014). Considerado um patógeno oportunista, a *E. coli* pode estar presente em vegetais crus, leite cru, queijos e frutos do mar (EDEN, 2014).

Bacillus cereus, é um bastonete Gram positivo, formador de esporos, encontrado com facilidade no solo e, conseqüentemente, em lavouras (JUNEJA et al., 2019; NGUYEN; TALLENT, 2019). O alimento em maior foco de isolamento desse patógeno é o arroz, seguido de vegetais crus, purê, laticínios, temperos e alimentos cozidos prontos para consumo (JUNEJA et al., 2019). Casos de consumo de arroz cozido contaminado são comuns. Segundo a revisão bibliográfica realizada por Juneja et al. (2019), Jang et al. (2006) isolaram *B. cereus* em 39,7% de 136 amostras de arroz, na Coreia do Sul. Porcentagem um pouco maior foi observada por Ankolekar et al. (2009), que encontraram esse micro-organismo em 52,8% de 178 amostras de alimentos crus vendidos no varejo, nos EUA. Mesmo que o cozimento seja capaz de eliminar as células vegetativas, os esporos são resistentes e quando germinam, as células vivas podem produzir uma toxina termoestável no alimento (100°/90 minutos) (JUNEJA et al., 2019).

B. cereus pode produzir dois tipos de DTA: a síndrome diarreica, que é uma infecção e causa uma diarreia aquosa com cólicas abdominais, iniciada após 6 a 15h do consumo, pela produção de toxina no intestino e a síndrome emética, uma intoxicação, pela ingestão da toxina pré formada no ambiente, com náuseas, vômitos e cólicas abdominais, iniciadas de 30 minutos a 6 horas (NGUYEN; TALLENT, 2019).

O potencial de produção de biofilmes, aderindo às superfícies, como tubulações em plantas de processamento de alimentos, pelo *B. cereus* é um forte ponto para dificultar sua eliminação, afetando a segurança higiênica da indústria (KUMARI; SARKAR, 2016). A resistência dos biofilmes resistindo aos processos de limpeza e desinfecção desses ambientes pode provocar contaminações recorrentes na linha de produção alimentar, fato esse que pode ser altamente prejudicial financeiramente para as empresas e ainda um risco ao consumidor (KUMARI; SARKAR, 2016).

Mundialmente são relatados casos de doenças transmitidas por bactérias proveniente de sushis e sashimis, pratos da cultura japonesa com peixe cru. Entre 1997 e 1999, *V. parahaemolyticus*, *B. cereus*, *S. aureus* e *Salmonella* estiveram envolvidos com 3% desses surtos segundo o Departamento de Alimentos e Meio Ambiente de Hong Kong (MIGUÉIS et al., 2015). Ainda, 87 pessoas foram contaminadas em cerca de 10 surtos na Austrália entre 2001 e 2007 com o mesmo tipo de alimento; assim como locais como Cingapura, Quennsland-Austrália e Nevada-EUA sofreram a mesma situação (MIGUÉIS et al., 2015)

O Regulamento Técnico Sobre Os Padrões Microbiológicos Para Alimentos decretado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – Resolução ANVISA - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, item 22 estabeleceu como padrões microbiológicos para pratos prontos para o consumo a base de carnes, pescados e similares crus (quibe cru, carpaccio, sushi, sashimi, etc.), a ausência de *Salmonella* em 25 g de alimento e a tolerância de até 10^2 NMP/g de coliformes termotolerantes (CTo) ou à 45°C/g de; até $5,0 \times 10^3$ UFC/g; de *Staphylococcus* coagulase positiva e até 10^3 NMP/g de *V. parahaemolyticus*. Embora não faça parte dessa resolução, foi realizada a pesquisa de *B. cereus*, devido à sua presença no arroz cozido de muitos desses alimentos. A mesma resolução apresenta o padrão de até 10^3 UFC/g para alimentos à base de cereais, farinhas, grãos e similares; saladas mistas, temperadas ou não, com ou sem molho, exceção das adicionadas de molho de maionese e similares, valor que iremos usar como base, para classificar essa contaminação.

2. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi verificar a qualidade microbiológica de alimentos advindos da culinária japonesa, comercializados nos restaurantes da cidade de Botucatu, SP, de acordo com os padrões estabelecidos pela ANVISA (RDC Nº 12, 2001). Os

isolados de ECP foram identificados até a espécie *S. aureus* por PCR, além da pesquisa da presença dos genes que codificam para a produção de biofilme (*bap*, *icaA* e *icaD*) e de algumas enterotoxinas (SEA- SEI). Além disso, foram testadas a produção *in vitro* de biofilme e o antibiograma para identificar MRSA (*S. aureus* resistente à metilicina).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aquisição e coleta das amostras

Foram analisadas 70 amostras variadas de comida japonesa, comercializadas na cidade de Botucatu-SP, no período de 2019-2020. As amostras foram transportadas em sacos plásticos esterilizados (114x229mm-Inlab), sob refrigeração, em caixa isotérmica contendo gelo reciclável, até o momento do processamento no laboratório, que ocorreu no mesmo dia.

3.2. Análises microbiológicas

3.2.1. Identificação de *Staphylococcus aureus*

Para a identificação e enumeração do *S. aureus* foi utilizada a metodologia de Bennett et al. (2015a), onde placas de Petri contendo ágar Baird-Parker (BP) suplementado com telurito de potássio e solução de gema de ovo receberam as amostras adequadamente homogeneizadas e diluídas (225 ml de água tamponada esterilizada em 25 g da amostra). A partir de cada diluição, um volume de 0,1 ml foi colocado sobre o ágar e espalhado com auxílio de uma alça em L. Em seguida, as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. Após a incubação, foi realizada a contagem das colônias características, que apresentaram cor negra e halo (Figura 1). Destas, até três colônias foram repicadas para tubos inclinados com ágar tripticase soja (TSA), e incubadas por 24 horas a 35°C.

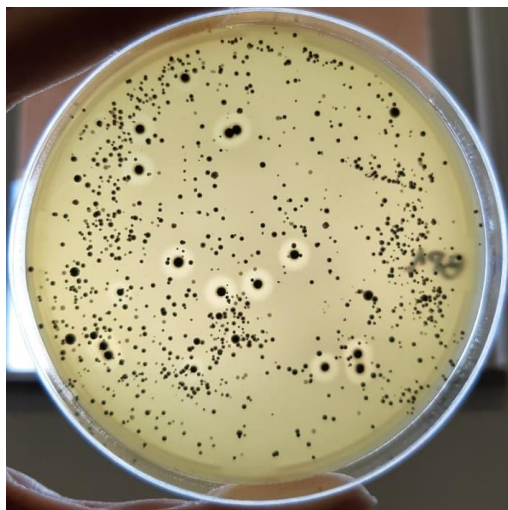


Figura 1: Placa de Baird-Parker (BP)

No teste da produção de catalase, uma porção do crescimento foi transferida para uma lâmina de vidro, com a adição de uma gota de água oxigenada 30%. Como controle positivo, foi utilizada uma cepa de *S. aureus* e como controle negativo, uma de *Streptococcus* sp. O teste positivo foi revelado pela liberação de bolhas. A seguir, foi realizado o teste da coagulase em tubo, onde 0,5ml de plasma de coelho foi acrescido de um volume igual de uma cultura da cepa teste em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) crescida por 24 horas a 35°C. Os tubos foram incubados a 35°C por até 24 horas. O teste foi considerado positivo quando ocorrer a coagulação da mistura.

As cepas identificadas como estafilococos coagulase positiva foram submetidas ao kit "Staphylect Test Dry Spot" (Oxoid), onde partículas azuis de látex foram recobertas com fibrinogênio humano e imunoglobulinas tipo G contra a proteína A de *S. aureus*, o fator *clumping* e a cápsula de *S. aureus* metilicina-resistente. O kit é acompanhado por um controle negativo, com glóbulos vermelhos não sensibilizados. A cepa a ser testada foi cultivada em TSA inclinado. Após incubação por 24 horas, a 35°C, uma alçada do crescimento foi colocada sobre uma gota de água tamponada esterilizada, previamente depositada em um papelão de fundo branco, que acompanha o kit. Com o auxílio da alça de níquel-cromo, foi realizada a homogeneização. As cepas positivas formaram grânulos devido à aglutinação, em até 6 segundos. Deve ser lembrado que procedimento igual foi repetido, usando-se o reagente não sensibilizado, que nunca aglutina, como controle negativo.

A seguir, a identificação foi confirmada pelo teste de PCR, utilizando-se um primer específico para essa espécie, do gene *nuc* (CRL, 2009). (Figura 2).

Para tal, ocorreram as seguintes etapas da PCR

a) Extração e Purificação de DNA

Para extração e purificação do DNA, as cepas isoladas foram cultivadas em caldo BHI, a 35°C/24 horas e 1 mL de cada crescimento foi transferido para tubos de microcentrifuga de 1,5 mL (Axygen) e submetidos a extração e purificação do DNA empregando-se o kit comercial “Minispin” (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. A seguir, a amostra foi congelada a - 20°C até o momento do uso para a reação em cadeia pela polimerase (PCR).

b) Amplificação do ácido nucléico (PCR)

Para as reações de PCR foram utilizados tubos de microcentrifuga de 0,5 mL (Axygen) num volume total de 25 µL, composto por 2,5 µL de PCR Buffer 10x (Invitrogen), 2,0 µM de Cloreto de Magnésio (Invitrogen), 200 µM de cada dNTP (Invitrogen), 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 10 picomoles de cada *primer* (Tabela 1), água ultrapura autoclavada (qsp) (Milli-Q Plus, Millipore) e 3 µL da amostra de DNA. A incubação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) empregando-se os parâmetros de um ciclo inicial a 94°C durante 5 minutos para desnaturação inicial, 94°C durante 2 minutos para desnaturação e 72°C durante 1 minuto para extensão.

c) Visualização dos produtos amplificados

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese (Electrophoresis Power Supply Model EPD 600 – Amersham-Pharmacia Biotech Inc.) em gel de agarose 1,5% (Sigma Aldrich) em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) e revelados com brometo de etídio (0,5 mg/ml - Invitrogen). Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com marcadores de DNA de 100 bp (100 Base Pair Ladder – Amersham – Pharmacia Biotech Inc.), sendo analisados e fotografados em analisador de imagens (AlphaImager – Alpha Easy FC Software – AlphaInotech Corporation).

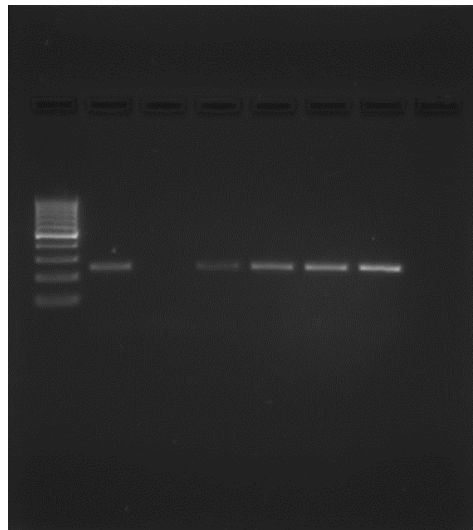


Figura 2: Gel de eletroforese da PCR para detecção do gene *nuc* em *S. aureus*: Poço 1: marcador de peso molecular (100 pb); poço 2: ATCC 29213 (287 pb); Poço 3: controle negativo; Poços 4 - 7: cepas positivas.

Tabela 1. Oligonucleotídeos e características das reações de PCR para a detecção de *Staphylococcus aureus* e de suas enterotoxinas.

Gene	Primer	Sequência	Tamanho produto (pb)	Temperatura anelamento	Referências
<i>nucEU</i>	Nuc-1	tcagcaaatgcatcacaacag			
	Nuc- 2	cgtaaatgcacttgcttcagg	287	55°C	CRL (2009)
<i>sea</i>	SEA-1	ttggaaacggtaaacgaa			
	SEA-2	gaaccttccatcaaaaaca	120	50°C	Johnson et al. (1991)
<i>seb</i>	SEB-1	tcgcatcaaactgacaaacg			
	SEB-2	gcaggtactctataagtgcc	478	50°C	Johnson et al. (1991)
<i>sec</i>	SEC-1	gacataaaagctaggaattt			
	SEC-2	aaatcggattaacattatcc	257	50°C	Johnson et al. (1991)
<i>sed</i>	SED-1	ctagtttgtaatatctcct			
	SED-2	taatgctatatcttataggg	317	50°C	Johnson et al. (1991)
<i>see</i>	SEE-1	: aggtttttcacaggtcatcc			
	SEE-2	ctttttttcttcggtaac	209	50°C	Johnson et al. (1991)
<i>seg</i>	SEG-1	aagtagacattttggcgttc			
	SEG-2	agaacctcaaaactcgtatagc	287		Omoe et al. (2002)
<i>seh</i>	SEH-1	gtctatatggaggtacaacact			
	SEH-2	gaccttacttatttcgctgtc	213		Omoe et al. (2002)
<i>sei</i>	SEI-1	ggtgatattggtgtaggtaac			
	SE-2	atccatattcttgccttaccag	454		Omoe et al. (2002)

Legenda. Pb: pares de bases

3.2.2. Detecção da presença de *Salmonella*

Para a detecção da presença de *Salmonella* foi utilizada a metodologia da American Public Health Association (Cox et al., 2015). Para tanto, 25g da amostra foram obtidas de maneira asséptica e colocadas em saco de polietileno estéril contendo 225mL de água peptonada tamponada. Em seguida, a mesma foi colocada em Stomacher por 30 segundos para completa homogeneização da amostra. O volume obtido foi transferido a um Erlenmeyer e incubado a 35°C/24 horas. Após este período, 1mL foi semeado em 10mL de caldo Tetrionato (TT) ao qual se adicionou um volume de 0,1mL de iodeto de potássio imediatamente antes do uso, seguindo-se de incubação a 35°C/24 horas. Outra alíquota de 0,1mL da amostra foi transferida para 10mL de caldo Rapaport-Vassiliadis (RV) e, a seguir, incubada a 43°C/24 horas. Após este período, uma alçada de cada tubo foi semeada em placas contendo ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD) e de ágar *Salmonella-Shigella* (SS). Após o período de incubação a 35°C por 24 horas, as colônias características de *Salmonella* foram repicadas para tubos inclinados de ágar Tripticase Soja (TSA). A partir destes, foram realizados testes bioquímicos de triagem em tubos inclinados de ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e ágar Fenil (Ágar Fenilalanina) (Figuras 3 e 4). As colônias que apresentaram reações típicas foram submetidas à identificação pelo sistema API-20E (Biomérieux) (Figura 5). As cepas que apresentaram confirmação positiva no API foram testadas frente aos soros polivalentes somático e flagelar.



Figura 3: TSI, respectivamente, característico e negativo para *Salmonella*

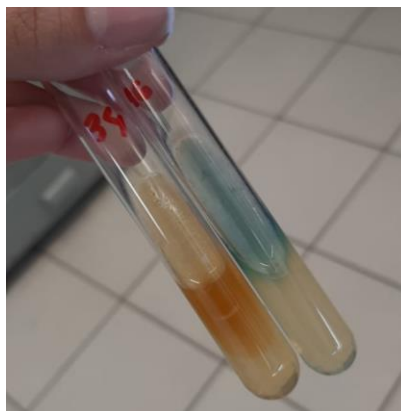


Figura 4: Fenilalanina, respectivamente, característica e negativa para *Salmonella*.



Figura 5: Cepas suspeitas de *Salmonella*, submetidas ao kit API 20E.

3.2.3. Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes

Esta determinação foi realizada empregando-se a técnica dos tubos múltiplos (Kornacki et al., 2015). Assim, na prova presuntiva, foram inoculadas diluições adequadas da amostra homogeneizada em volumes de 1mL, em uma série de três tubos por diluição, contendo 10mL de caldo Lauril Sulfato (LST) e um tubo de Durham invertido. Os tubos foram incubados a 35°C por 24-48 horas. Após este período, foi procedida a prova de confirmação para CTo por meio da transferência de três alçadas de cada tubo positivo (com crescimento e produção de gás) para tubos contendo 5mL de caldo EC, os quais foram incubados em estufa BOD a 45°C por 24 horas. Após o período de incubação, foi realizada a leitura, considerando-se positivos os tubos de caldo EC que

apresentaram produção de gás no tubo de Durham. A seguir, juntamente com a tabela do NMP, foi determinado o NMP de CTo por grama de amostra.

3.2.4. Enumeração de bactérias do grupo *Bacillus cereus*

Na técnica da semeadura em superfície, 0,1 mL das diluições seriadas decimais de uma amostra foram depositadas na superfície do ágar gema de ovo-polimixina-vermelho de fenol e espreiadas com o auxílio de um bastão de vidro em L. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e ao final deste período, não se observou o crescimento de colônias características. As cepas seriam submetidas à produção de biofilme, caso houvesse crescimento. (Bennett et al., 2015b)

3.2.5. Número Mais Provável de *Vibrio parahaemolyticus*

Esta determinação foi realizada empregando-se a técnica dos tubos múltiplos (DePaola e Jones, 2015). Assim, na prova presuntiva, foram inoculadas as diluições 10^{-1} a 10^{-3} da amostra homogeneizada em volumes de 1mL, em uma série de três tubos por diluição, contendo 10mL de água peptonada alcalina (APA). Os tubos foram incubados a 35°C por 18- 24 horas. Após este período, uma alçada de cada tubo foi semeada em ágar tiosulfato-citrato e sais biliares (TCBS), incubados sob as mesmas condições dos tubos. Após o período de incubação, não se observou o crescimento de colônias características.

3.3. Pesquisa de fatores de virulência (produção de biofilme e de enterotoxinas) nos isolados de estafilococos coagulase negativa e de *S. aureus*

a) Extração e Purificação de DNA

A extração de DNA de todos os isolados envolvidos ocorreu como previamente descrito no item 2.3.1.

b) Amplificação do ácido nucléico (PCR)

Enterotoxinas: Para as reações de PCR foram utilizados tubos de microcentrífuga de 0,5 mL (Axygen) num volume total de 25 µL, composto por 2,5 µL de PCR Buffer 10x (Invitrogen), 2,0 µM de Cloreto de Magnésio (Invitrogen), 200 µM de cada dNTP (Invitrogen), 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 10 picomoles de

cada *primer* (Tabela 1), água ultrapura esterilizada (qsp) (Milli-Q Plus, Millipore) e 3 µL da amostra de DNA. A incubação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) empregando-se os parâmetros de um ciclo inicial a 94°C durante 5 minutos para desnaturação inicial, 94°C durante 2 minutos para desnaturação e 72°C durante 1 minuto para extensão. Em relação à temperatura de anelamento dos “primers”, para as toxinas A, B, C e D, foi utilizada a temperatura inicial de 50°C, com redução de 1°C por ciclo, nos 4 ciclos seguintes. No sexto ciclo, a temperatura de anelamento se encontrou a 45°C, sendo mantida para os próximos 25 ciclos. Ao final dos 30 ciclos a temperatura de extensão final foi de 72°C por 5 minutos e resfriamento a 4°C. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água ultrapura. Os controles positivos usados foram *S. aureus* ATCC 13565 (*sea*), ATCC 14458 (*seb*), ATCC 19095 (*sec*), FRI 361 (*sed*).

Biofilme: Os genes *bap*, *icaA* e *icaD* foram pesquisados nos isolados de *S. aureus*, utilizando os parâmetros segundo Cucarella et al. (2001) e Vasudevan et al. (2003), respectivamente (Tabela 2). Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água ultrapura. Os controles positivos usados na reação foram *S. aureus* ATCC 35983 (*ica* cluster) e um isolado *bap*-positivo sequenciado (Castilho et al., 2017).

c) Visualização dos produtos amplificados

A visualização dos produtos da PCR ocorreu como previamente descrito no item 2.3.1.

Tabela 2. Oligonucleotídeos e características das reações de PCR para a detecção de genes produtores de biofilme.

Gene	Primer	Sequência	Tamanho produto (pb)	Temperatura anelamento	Referências
<i>bap</i>	F	ccctatatcgaaggtgtagaattg	97	58°C	Cucarella et al. (2001)
	R	gctgttgaagttaataactgtacctgc			
<i>icaA</i>	F	cctaactaacgaaggtag	1315	49°C	Vasudevan et al. (2003)
	R	aagatatagcgataagtgc			
<i>icaD</i>	F	aaacgtaagagaggtgg	381	55.5°C	Vasudevan et al. (2003)
	R	ggcaatatgatcaagatac			

Legenda. Pb: pares de bases

3.4. Pesquisa de enterotoxinas clássicas de *S. aureus*

Esse item não foi realizado, pois nenhum dos isolados de *S. aureus* apresentou genes que codificam para as enzimas clássicas (*sea -see*).

3.5. Produção de biofilme por *S. aureus*, em microplaca de poliestireno

A verificação e quantificação de biofilme em microplaca de poliestireno foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Vasudevan et al. (2003), para *S. aureus*. Cada cepa de *S. aureus* foi incubada em caldo tripton de soja (TSB, tryptic soy broth) a 35°C/24h. A seguir, cada cultura foi diluída a, aproximadamente, $1,5 \times 10^8$ UFC (0,5 escala de MacFarland), com o auxílio do Densicheck (Biomérieux), utilizando-se o caldo específico acrescido de 0,5% de glicose. Uma alíquota de 200 µL foi semeada em quadruplicata, em microplaca de 96 poços. Após incubação a 35°C/48 horas (*S. aureus*), cada placa foi lavada três vezes, com PBS (pH 7,4), seca à temperatura ambiente e corada com violeta cristal 1%, por 15 minutos. Após três lavagens com água destilada, para a remoção do corante, a placa foi seca em temperatura ambiente e colocada em um leitor de ELISA (Babsystems, MultiSkan EX) (570 nm). As cepas que apresentaram valores

maiores que 0,1 foram consideradas produtoras de biofilme. Os testes foram realizados em triplicata.

3.6. Teste de disco-difusão

O teste de sensibilidade de disco-difusão será realizado de acordo com Bauer et al. (1966), com interpretação conforme recomendações do CLSI (2012), utilizando discos impregnados com oxacilina (1µg) e cefoxitina (30µg).

Uma suspensão de aproximadamente 10^8 UFC/ml, correspondente à escala 0,5 de McFarland, será semeada com uma zaragatoa na superfície da placa de Mueller-Hinton Agar (Oxoid). Após absorção do inóculo pelo meio de cultura, os discos impregnados com os antimicrobianos serão dispostos na superfície da placa, incubada 35°C/24h. De acordo com o diâmetro do halo formado pelo antimicrobiano, a amostra será classificada em sensível, intermediária ou resistente. (REINOSO et al., 2008)

4. RESULTADOS

Foram processadas 70 amostras de alimentos variados da culinária japonesa, comercializados em 14 restaurantes de Botucatu/SP, até o mês de dezembro de 2019. Após esse período foram realizadas as identificações definitivas por PCR, a pesquisa dos genes produtores de enterotoxinas, a produção de biofilme pelas cepas de *S. aureus* e o antibiograma dos mesmos.

Na RDC N°12 (2001) existia o item 22 (Pratos prontos para o consumo (alimentos prontos de cozinhas, restaurantes e similares) e o subitem (b) se relacionava a “alimentos da cozinha japonesa a base de carnes, pescados e similares crus” (Quibe cru, carpaccio, sushi, sashimi, etc.), sendo que parâmetros microbiológicos específicos eram a pesquisa da presença de *Salmonella*, enumeração de estafilococos coagulase positiva e de *Vibrio parahaemolyticus*, além da enumeração (UFC) ou determinação (NMP) de CTo, como foi pesquisado nesse projeto. Todas as amostras foram analisadas até final de dezembro de 2019.

No retorno às atividades, na segunda semana de janeiro, ocorreu a identificação definitiva dos isolados (dependentes de reações de PCR), além da pesquisa dos genes propostos e da produção de biofilme. Foi quando também o grupo de pesquisa tomou

conhecimento dos novos parâmetros estabelecidos pela Instrução Normativa (IN) N° 60, de 23 de dezembro de 2019. Nessa IN, alimentos tão específicos como o descrito no item 22b da RDC N°12 (2001) desapareceram e esses pratos da culinária japonesa se encaixariam, genericamente no item 21 (Alimentos preparados prontos para o consumo), item (b) (Alimentos preparados prontos para o consumo contendo produtos de origem animal, elaborados sem emprego de calor, consumidos crus). Entretanto, os novos parâmetros são a pesquisa da presença de *Salmonella*, enumeração de estafilococos coagulase positiva e a enumeração (UFC) ou determinação (NMP) de *E. coli*. Nas análises realizadas até dezembro de 2019, foram pesquisados somente os coliformes termotolerantes, não ocorrendo a confirmação até *E. coli*. Por isso, optou-se pela apresentação dos resultados e sua discussão, conforme RDC N°12 (2001), pela ausência dos dados referentes à pesquisa de *E. coli*.

A Tabela 3 contém a descrição do tipo de alimento e seu respectivo resultado para estafilococos coagulase positiva (ECP), *Bacillus cereus* (BC), *Salmonella sp.*, número mais provável de *Vibrio parahaemolyticus* (VP) e de CTo e o CTo máximo permitido pela RDC N°12.

Tabela 3. Pesquisa dos parâmetros microbiológicos para pratos prontos para o consumo a base de pescados e similares crus, segundo a RDC N°12 (2001), na cidade de Botucatu/SP (2019) (continua).

Amostra	ECP/g (UFC/g)	BC (UFC/g)	<i>Salmonella</i> sp (25g)	NMP/g VP	NMP/g CTo	NMP/g CTo máximo permitido
Hossomaki	1x10 ²	< 100	Ausência	< 3	2,4 x 10 ²	10 ²
Gunkan	< 100	< 100	Ausência	< 3	9,3 x 10	10 ²
Hossomaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	2,4 x 10 ²	10 ²
Hossomaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	< 3	10 ²
Uramaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	< 3	10 ²
Gunkan	< 100	< 100	Ausência	< 3	>2,4 x 10 ³	10 ²
Uramaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	< 3	10 ²
Hossomaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	7,3	10 ²

ECP: estafilococos coagulase positiva; BC: *Bacillus cereus*; VP: *Vibrio parahaemolyticus*; CTo: coliformes termotolerantes, UFC: Unidades Formadoras de Colônias; MNP: Número Mais Provável; NE: Análise Não Exigida pela RDC N° 12 (2001).

Tabela 3. Pesquisa dos parâmetros microbiológicos para pratos prontos para o consumo a base de pescados e similares crus, segundo a RDC N°12 (2001), na cidade de Botucatu/SP (2019) (continuação).

Amostra	ECP/g (UFC/g)	BC (UFC/g)	<i>Salmonella</i> sp (25g)	NMP /g VP	NMP/g CTo	NMP/g CTo máximo permitido
Hossomaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	3,6	10 ²
Uramaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	3,6	10 ²
Hossomaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	3,6	10 ²
Uramaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	7,3	10 ²
Uramaki	1,5x10 ³	< 100	Ausência	< 3	< 3	10 ²
Hossomaki	4x10 ²	< 100	Ausência	< 3	3,6	10 ²
Niguiiri	< 100	< 100	Ausência	< 3	4,3 x 10	10 ²
Uramaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	< 3	10 ²
Uramaki	2x10 ²	< 100	Ausência	< 3	< 3	10 ²
Hossomaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	< 3	10 ²
Gunkan	< 100	< 100	Ausência	< 3	< 3	10 ²
Temaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	< 3	10 ²
Temaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	< 3	10 ²
Niguiiri	< 100	< 100	Ausência	< 3	1,5 x 10	10 ²
Uramaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	2,3 x 10	10 ²
Hossomaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	< 3	10 ²
Uramaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	3,6	10 ²
Joy Pepino	< 100	< 100	Ausência	< 3	< 3	10 ²
Uramaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	< 3	10 ²
Joy Pepino	1 x 10 ²	< 100	Ausência	< 3	< 3	10 ²
Uramaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	9,3 x 10	10 ²
Uramaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	3,6	10 ²
Hossomaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	< 3	10 ²
Hossomaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	< 3	10 ²
Uramaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	4,6 x 10 ²	10 ²
Niguiiri	< 100	< 100	Ausência	< 3	9,3 x 10	10 ²
Gunkan	< 100	< 100	Ausência	< 3	>2,4 x 10 ³	10 ²
Uramaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	>2,4 x 10 ³	10 ²
Hossomaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	>2,4 x 10 ³	10 ²
Niguiiri	< 100	< 100	Ausência	< 3	>2,4 x 10 ³	10 ²
Hot Roll	< 100	< 100	Ausência	NE	9,3 x 10	10 ²

ECP: estafilococos coagulase positiva; BC: *Bacillus cereus*; VP: *Vibrio parahaemolyticus*; CTo: coliformes termotolerantes, UFC: Unidades Formadoras de Colônias; MNP: Número Mais Provável; NE: Análise Não Exigida pela RDC N° 12 (2001).

Tabela 3. Pesquisa dos parâmetros microbiológicos para pratos prontos para o consumo a base de pescados e similares crus, segundo a RDC N°12 (2001), na cidade de Botucatu/SP (2019) (continuação).

Amostra	ECP/g (UFC/g)	BC (UFC/g)	Salmonella sp (25g)	NMP /g VP	NMP/g CTo	NMP/g CTo máximo permitido
Hossomaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	>2,4 x 10 ³	10 ²
Uramaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	4,6 x 10 ²	10 ²
Uramaki	< 100	< 100	Ausência	NE	1,1 x 10 ³	10 ²
Hossomaki	< 100	< 100	Ausência	NE	1,1 x 10 ³	10 ²
Hossomaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	2,4 x 10 ²	10 ²
Uramaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	4,3 x 10	10 ²
Hossomaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	>2,4 x 10 ³	10 ²
Uramaki	< 100	< 100	Ausência	S	>2,4 x 10 ³	10 ²
Gunkan	< 100	< 100	Ausência	< 3	2,4 x 10 ²	10 ²
Hossomaki	< 100	< 100	Ausência	NE	>2,4 x 10 ³	10 ²
Uramaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	>2,4 x 10 ³	10 ²
Uramaki	< 100	< 100	Ausência	NE	>2,4 x 10 ³	10 ²
Hossomaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	1,1 x 10 ³	10 ²
Hot Roll	< 100	< 100	Ausência	NE	4,6 x 10 ²	10 ²
Uramaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	2,3 x 10	10 ²
Gunkan	< 100	< 100	Ausência	< 3	< 3	10 ²
Hossomaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	< 3	10 ²
Temaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	< 3	10 ²
Hot Roll	< 100	< 100	Ausência	NE	4,3 x 10	10 ²
Hossomaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	1,1 x 10 ³	10 ²
Temaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	>2,4 x 10 ³	10 ²
Hossomaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	9,1	10 ²
Gunkan	< 100	< 100	Ausência	< 3	1,5 x 10 ²	10 ²
Niguiiri	< 100	< 100	Ausência	< 3	4,6 x 10 ²	10 ²
Uramaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	< 3	10 ²
Uramaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	9,3 x 10	10 ²
Temaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	4,6 x 10 ²	10 ²
Hossomaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	3,6	10 ²
Gunkan	< 100	< 100	Ausência	< 3	4,3 x 10	10 ²
Uramaki	< 100	< 100	Ausência	< 3	2,3 x 10	10 ²
Niguiiri	< 100	< 100	Ausência	< 3	1,5 x 10 ²	10 ²

ECP: estafilococos coagulase positiva; BC: *Bacillus cereus*; VP: *Vibrio parahaemolyticus*; CTo: coliformes termotolerantes, UFC: Unidades Formadoras de Colônias; MNP: Número Mais Provável; NE: Análise Não Exigida pela RDC N° 12 (2001).

Entre as 70 amostras analisadas, 50 (71,4%) apresentaram CTo, sendo que somente 27 (38,6%) estavam acima dos limites estabelecidos pela RDC N°12 (2001). Não foram observadas colônias características de *V. parahaemolyticus* e *B. cereus*. Em relação à *Salmonella* sp, apesar de várias amostras apresentarem colônias características os testes confirmatórios descartaram a presença dessa bactéria nos alimentos.

S. aureus foi observado em 5 (7,1%) amostras. Em relação aos genes que codificam as enterotoxinas, o gene *seg* e *sei* foram os mais encontrados, estando presentes concomitantemente em 2 (40%) isolados, o *seh* foi observado em outros 2 (40%) isolados e os genes das enterotoxinas clássicas não foram detectados (Figuras 6, 7 e 8; Tabela 4). Todos os *S. aureus* foram considerados produtores de biofilme, embora nenhum tenha sido classificado como forte produtor. O gene *bap*, um dos principais envolvidos no desenvolvimento do biofilme não foi encontrado, em contrapartida, o *icaD* esteve presente em todos os isolados e o *icaA* em 40% (2/5) dos isolados (Tabela 4). Todos os *S. aureus* apresentaram sensibilidade à oxacilina (1µg) e cefoxitina (30µg) (Tabela 5).

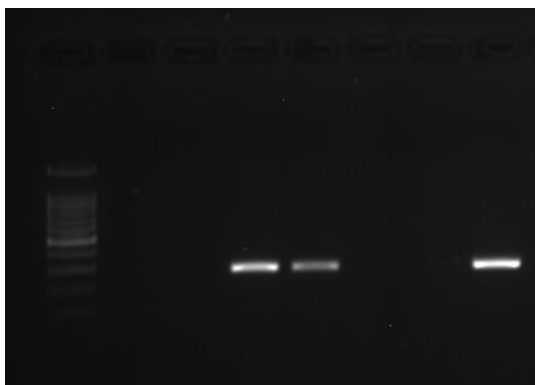


Figura 6: Gel de eletroforese da PCR para detecção do gene *seg* em *S. aureus*: Poço 1: marcador de peso molecular (100 pb); Poços 2-6: amostras; Poço 7: controle negativo; Poço 8: FRI 361 (287 pb).

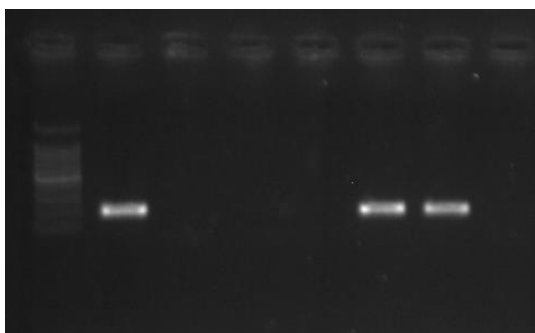


Figura 7: Gel de eletroforese da PCR para detecção do gene *seh* em *S. aureus*: Poço 1: marcador de peso molecular (100 pb); poço 2: FRI 137 (213 pb); Poço 3: controle negativo; Poços 4-8: amostras.

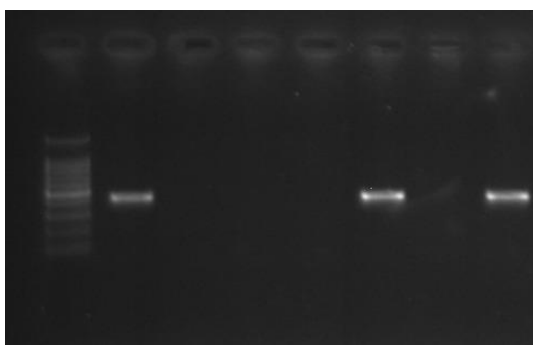


Figura 8: Gel de eletroforese da PCR para detecção do gene *sei* em *S. aureus*: Poço 1: marcador de peso molecular (100 pb); poço 2: FRI 361 (454 pb); Poço 3: controle negativo; Poços 4-8: amostras.

Embora não fizessem parte dos objetivos, por não serem parâmetros a serem pesquisados pela RDC N°12 (2001), os isolados de estafilococos coagulase negativa (ECN), obtidos de 31 (44,3%) amostras, foram analisados quanto as mesmas enterotoxinas e nenhum deles apresentaram os genes pesquisados.

Tabela 4. Pesquisa dos genes responsáveis pela produção de enterotoxinas e biofilme em cepas de *Staphylococcus aureus*, isolados de alimentos prontos para o consumo, à a base de pescados e similares crus, na cidade de Botucatu/SP (2019).

N	R	Enterotoxinas									Biofilme		Classificação
		<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>bap</i>	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	
1	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	Moderado
13	B	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	Moderado
14	B	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	Moderado
17	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Moderado
28	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	Moderado

N: número da amostra; R: restaurante.

Tabela 5. Antibiograma em cepas de *Staphylococcus aureus*, isolados de alimentos prontos para o consumo, à a base de pescados e similares crus, na cidade de Botucatu/SP (2019).

N	R	Oxacilina (1µg)	Cefoxitina (30µg)
1	1	Sensível	Sensível
13	2	Sensível	Sensível
14	2	Sensível	Sensível
17	3	Sensível	Sensível
28	1	Sensível	Sensível

N: número da amostra; R: número do restaurante.

5. DISCUSSÃO

Os alimentos da culinária japonesa são considerados importantes fontes de DTAs, visto que têm como base pescados crus, os quais não são previamente tratados termicamente para o controle microbiano. Ainda, o contato com as mãos durante o preparo do alimento eleva o risco de contaminação por *S. aureus* e CTo (ALCÂNTARA, 2009). Os CTo são utilizados como indicadores higiênico-sanitários, e sua presença indica a manipulação inadequada dos alimentos (ALCÂNTARA, 2009). No presente estudo, a pesquisa desse indicador demonstrou que 38,57% dos alimentos analisados estavam acima dos valores permitidos pela RDC N°12 (2001), resultado similar ao de Perassoli e Frigo (2019), no qual 30% das suas amostras de sushi e sashimi apresentaram CTo acima do permitido, na cidade de Maringá –PR. Sato (2013) verificou 30 restaurantes na região de Ribeirão Preto –SP e também obteve resultados semelhantes, no qual 33,3% das amostras ultrapassaram os parâmetros estabelecidos. Moraes et al (2019), por sua vez, encontraram maior porcentagem ao analisar 20 amostras em Pelotas - RS, onde 50% apresentaram valores superiores ao permitido.

Em nenhuma das amostras analisadas foi encontrada *Salmonella spp.*, assim como no trabalho de Alcântara (2009), numa pesquisa em restaurantes de Fortaleza – CE e de Geiss et al. (2005) que avaliaram 6 amostras em Toledo –PR. Lucena (2015) ao testar amostras de duas cidades diferentes, João Pessoa e Campina Grande - PB, confirmou a presença da bactéria em 13,3% de 30 amostras verificadas. Já Perassoli e Frigo (2019), ao analisarem 30 amostras de pratos da culinária japonesa, encontraram contaminação por *Salmonella spp* em 10%.

Em relação ao *V. parahaemolyticus*, não houve o isolamento dessa bactéria em nenhuma amostra, resultado coerente à de outras pesquisas realizadas no Brasil (VALLANDRO, 2010; SATO, 2013; MORAES, 2019), indicando que o patógeno não é comumente encontrado no país. Vallandro (2010) relacionou a criação do salmão consumido no Brasil, em águas frias e transporte congelado com à baixa ocorrência desse micro-organismo nessa matéria prima e, conseqüentemente, nos alimentos analisados.

A acidificação do arroz do sushi, etapa do preparo que intensifica seu sabor, é realizada a fim de reduzir o possível crescimento de patógenos. O estudo de Mohammad et al. (2020) demonstrou que essa acidificação, atrelada à temperatura adequada, é eficaz para inibir o crescimento de *B. cereus*, o que pode justificar sua ausência nas amostras analisadas no presente estudo. Ainda que a legislação brasileira não exija a análise desse

patógeno para sushis e sashimis, pesquisas realizadas, como no estudo de Batista et al (2017), já evidenciaram a importância da mesma, uma vez que encontraram 22,2% das amostras com *B. cereus*.

S. aureus foi encontrado em 7,14% das amostras analisadas nesse trabalho, sendo que todas estavam dentro do parâmetro permitido pela RDC N° 12 (2001), de até 5×10^3 UFC/g. Braghini et al (2015) não isolaram estafilococos coagulase positiva em amostras de *sashimi* comercializados em Maringá – PR. Valores superiores foram apresentados por Santos et al (2012), que identificaram *S. aureus* em 57,1% das amostras analisadas em Aracaju – SE, entretanto, apenas 11,4% ultrapassaram o limite permitido pela legislação.

Em relação aos *S. aureus* isolados neste estudo, nenhum apresentou o gene *bap*. Considerando que esse gene ainda não foi encontrado em isolados de origem humana, somente em bovinos, o resultado é coerente com a hipótese de que a contaminação advém da manipulação (CASTILHO, 2016). Por outro lado, foi observada a presença do *icaD* em todos os isolados e do *icaA* em 40%. Castilho (2016), realizando análise de 7 cepas de *S. aureus*, verificou a presença dos genes *icaA* e *icaD* em 57,1%. Já, Andre (2015) observou a presença do *icaA* em todos os *S. aureus* avaliados, enquanto *icaD* foi identificado em 66,7%.

Considerando a relação desses genes à produção de biofilme (CASTILHO, 2016), é coerente o potencial de formação observado em todos os isolados desse estudo. O trabalho de Soares et al. (2017) fez observação similar ao confirmar o potencial de formação de biofilme nos 8 isolados verificados obtidos de sushis em Pelotas-SP. Semelhantemente, Pua et al. (2018) observaram essa capacidade em todos os 52 isolados analisados. A formação de biofilme permite a adesão das bactérias às superfícies de manipulação, como por exemplo tabuas de corte, assim aumentando a ocorrência de contaminação cruzada dos alimentos (DANTAS, 2014).

Apesar de todos os isolados terem resultado como negativo para a presença dos genes das SE clássicas, os genes *seg* e *sei* foram detectados com maior frequência, em 2 das 5 cepas testadas (40%). Orwin et al. (2003) observaram que os genes que codificam para as toxinas G, I, M, N e O pertencem ao mesmo *cluster* e a detecção de um desses genes, geralmente indica a presença dos outros quatro. Em 2009, Wang et al. observaram que esse *cluster*, chamado de *egc* está localizado na ilha de patogenicidade Tipo II vSaB e que eventualmente pode também albergar o gene *selu*, além dos outros cinco já citados. Ainda, *seh* foi detectada em dois (40%) dos isolados. Pua et al (2016), identificaram

11,5% de *S. aureus* positivos para o gene *seg*, 7,7% para *sei* e 1,9% para *seh* ao estudar 52 isolados obtidos em pesquisa com 200 amostras de Klang Valley. O trabalho de Sato (2017), por sua vez, além da identificação de *seg* e *sei* em 14,3% e 28,6% de amostras, respectivamente, detectou 28,6% de positivos para o gene *sea*. A presença dos genes de virulência demonstra o potencial patogênico e dos isolados de *S. aureus*. (PUAH et al., 2016)

A sensibilidade apresentada pelos isolados à oxacilina (1µg) e cefoxitina (30µg) é coerente, tendo em vista que o MRSA é reconhecido como um patógeno principalmente de origem hospitalar (COLLI et al, 2009). Entretanto, há um aumento de infecções por MRSA adquiridas na comunidade sendo observado em publicações ao longo dos anos (COLLI et al, 2009). Almeida et al (2019) constataram 45% de resistência para oxacilina em antibiograma de cepas de *S. aureus* isolados de sushi em Teresina-PI.

É válido ressaltar as limitações para a identificação de *S. aureus*, já que houve o crescimento de colônias características da espécie no meio Baird-Parker, as quais posteriormente foram confirmadas como *Staphylococcus spp* e *Micrococcus*. Falhas na seletividade do meio foram anteriormente relatadas por Pereira (2006), em pesquisa utilizando amostras de salame, no qual revelou a dificuldade de diferenciação de *Staphylococcus* e *Micrococcus* apenas por meio da morfologia das colônias no meio, coloração de Gram e teste de catalase. Nascimento et al (2001) relataram o crescimento de leveduras apresentando a morfologia típica de colônias de *S. aureus*, em análise de queijo Minas.

6. CONCLUSÃO

A preparação de alimentos de origem japonesa é caracterizada por alta manipulação, além de muitos pratos típicos não passarem pelo processo de cozimento, assim demandando altos padrões de higiene. A presença de bactérias patogênicas com potencial enterotoxigênico e de indicadores de qualidade higiênico sanitárias demonstraram um risco à saúde pública indicando a necessidade de novas estratégias na fabricação desses alimentos, visando a saúde do consumidor.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÂNTARA, B. M. Qualidade higiênico-sanitária de sushi e sashimi servidos em restaurantes da cidade de Fortaleza: modismo alimentar e risco à saúde. p. 81, 2009.
- ALMEIDA, W. S., et al. Qualidade microbiológica e atividade antimicrobiana de cepas de estafilococos coagulase positiva isolados de sushis. **Journals UFRPE**, v. 13 n. 1, 2019.
- ANDRE, C. Adesão, formação e composição de biofilme por *Staphylococcus aureus* em poliestireno na presença de nisina. 49 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. 2015.
- BATT, C. A. *Escherichia coli*. In: BATT, C. A.; TORTORELLO, M. L. (Eds.). **Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)**. Oxford: Academic Press, 2014. p. 688–694.
- BATISTA, C. M. et al. Microbiological and Physicochemical Qualities of Sushi and Sashimi from Japanese Restaurants in Brazil. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 5, n. 10, p. 729–735, 20 set. 2017
- BRAGHINI, F.; ALEXANDRINO, E. G.; LEITE, F. P.; KEMMELMEIER, E. G.; GONÇALVES, J. E. Análise microbiológica de sashimis a base de salmão, comercializados na cidade de Maringá-PR. **Enciclopédia Biosfera**. 2015.
- CASTILHO, I. G. Capacidade de adesão, invasão e produção de biofilme em superfície biótica e abiótica por *Staphylococcus aureus* isolados de leite de vacas com mastite subclínica. 28 jul. 2016.
- CHEN, Y.-R. et al. Kinetic analysis and dynamic prediction of growth of *Vibrio parahaemolyticus* in raw white shrimp at refrigerated and abuse temperatures. **Food Control**, v. 100, p. 204–211, 1 jun. 2019.
- DANTAS, S. T. A. Transferência de *Salmonella* Enteritidis por contaminação cruzada e formação de biofilme em diferentes superfícies de corte. 2014. 52 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, 2014.
- DOS SANTOS, R. R. et al. Occurrence, genetic diversity, and control of *Salmonella enterica* in native Brazilian farmed fish. **Aquaculture**, v. 501, p. 304–312, 25 fev. 2019.
- EDEN, R. Enterobacteriaceae, coliforms and *E. coli* | Classical and modern methods for detection and enumeration. In: BATT, C. A.; TORTORELLO, M. L. (Eds.). **Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)**. Oxford: Academic Press, 2014. p. 667–673.
- FETSCH, A. et al. *Staphylococcus aureus* food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream. **International Journal of Food Microbiology**, v. 187, p. 1–6, 18 set. 2014.
- GEISS, J. M. T.; HERINGER, F. L. G.; WENZEL, J. B. Wasabi Japonica antimicrobial effect on pathogenic bacteria and microbiological quality of salmon sushi samples in two establishments in the city of Toledo – PR, Brazil. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 6, n. 3, p. 65–77, 17 dez. 2015.

- HUANG, C. et al. Isolation, characterization, and application of a novel specific *Salmonella* bacteriophage in different food matrices. **Food Research International**, v. 111, p. 631–641, 1 set. 2018a.
- HUANG, Y.-S. et al. The risk of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with consumption of raw oysters as affected by processing and distribution conditions in Taiwan. **Food Control**, v. 86, p. 101–109, 1 abr. 2018b.
- JUNEJA, V. K. et al. Predictive model for growth of *Bacillus cereus* during cooling of cooked rice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 290, p. 49–58, 2 fev. 2019.
- KUMARI, S.; SARKAR, P. K. *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. **Food Control**, v. 69, p. 20–29, 1 nov. 2016.
- LIANG, W.-L. et al. The microbiological quality of take-away raw salmon finger sushi sold in Hong Kong. **Food Control**, v. 69, p. 45–50, 1 nov. 2016.
- LUCENA, T.P. et al. Ocorrência de coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp. em sushis comercializados nas cidades de João Pessoa e Campina Grande/PB. **5º Simpósio de Segurança Alimentar - Alimentação e Saúde**. 2015.
- MENGIST, A.; MENGISTU, G.; RETA, A. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of *Salmonella* and *Shigella* among food handlers in catering establishments at Debre Markos University, Northwest Ethiopia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 75, p. 74–79, 1 out. 2018.
- MIGUÉIS, S. et al. Evaluation of ready to eat sashimi in northern Portugal restaurants. **Food Control**, v. 47, p. 32–36, 1 jan. 2015.
- MOHAMMAD, Z. H.; PAYTON, L.; SIRSAT, S. A. Efficacy of sushi rice acidification: Quantification of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* during simulation of retail practices. **LWT**, v. 131, p. 109884, 1 set. 2020.
- MONTANARI, A. S. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de sashimis de salmão, preparados e comercializados em restaurantes japoneses no município de JI-Paraná – RO. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 2, n. 1, 14 jun. 2015.
- MORAES, T. P. DE; DARLEY, F. M.; TIMM, C. D. Avaliação microbiológica de sushi e sashimi preparados em restaurantes especializados. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 18, n. 2, p. 254–257, 19 jun. 2019.
- NASCIMENTO, M. G. F.; CORBIA, A. C. G.; NASCIMENTO, E. R. Limitações da técnica de isolamento e enumeração de *Staphylococcus aureus*. 2001.
- NGUYEN, A. T.; TALLENT, S. M. Screening food for *Bacillus cereus* toxins using whole genome sequencing. **Food Microbiology**, v. 78, p. 164–170, 1 abr. 2019.
- NORMANNO, G. et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 290–296, 20 abr. 2007.
- ORWIN, P.M.; FITZGERALD, J.R.; LEUNG, D.Y.M. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. **Infect. Immunity**, v. 71, p. 2916-2919, 2003.

PARK, K. et al. Occurrence and virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seawater and bivalve shellfish of the Gyeongnam coast, Korea, in 2004–2016. **Marine Pollution Bulletin**, v. 137, p. 382–387, 1 dez. 2018.

PATEL, A. K. et al. Enterobacteriaceae, coliforms and *E. coli* | introduction. In: batt, c. A.; tortorello, m. L. (eds.). **Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)**. Oxford: Academic Press, 2014. p. 659–666.

PERASSOLI, A. A.; FRIGO, G. Análise higiênico-sanitária de sushi e sashimi comercializados em estabelecimentos na cidade de Maringá – PR. 2019.

PEREIRA, K. S. Identificação e verificação do potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa isolados a partir de salames brasileiros industrializados e avaliação da qualidade microbiológica do produto. 2006.

PUAH, S. M.; CHUA, K. H.; TAN, J. A. M. A. Virulence Factors and Antibiotic Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolates in Ready-to-Eat Foods: Detection of *S. aureus* Contamination and a High Prevalence of Virulence Genes. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 2, fev. 2016.

PUAH, S. M. et al. Diverse Profiles of Biofilm and Adhesion Genes in *Staphylococcus aureus* Food Strains Isolated from Sushi and Sashimi. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 9, p. 2337–2342, set. 2018.

SANTOS, A. A. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de sushi comercializado em restaurantes de Aracaju, Sergipe. **Scientia Plena**, v. 8, n. 3(a), 29 maio 2012.

SATO, R. A. Características microbiológicas de sushis adquiridos em estabelecimentos que comercializam comida japonesa. **Aleph**, p. vi, 44 p., 2 jul. 2013.

SATO, R. A. Qualidade microbiológica e pesquisa de genes codificadores de fatores de virulência do *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Salmonella*, em sushis. 1 dez. 2017.

SHEN, X. et al. Efficacy of *Vibrio parahaemolyticus* depuration in oysters (*Crassostrea gigas*). **Food Microbiology**, v. 79, p. 35–40, 1 jun. 2019.

SILVA, C. DE A. E. Mercado de comida japonesa no Distrito Federal: análise das oportunidades de negócio por meio de Geomarketing e Máquinas de Suporte Vetorial. 16 jul. 2015.

SOARES, K. D. S. et al. Formação de biofilme por isolados de estafilococos coagulase positiva provenientes de sushis da cidade de Pelotas, RS. Congresso de Iniciação Científica - Universidade Federal de Pelotas. 2017.

SOSPEDRA, I.; SORIANO, J. M.; MAÑES, J. Enterotoxinomics: The omic sciences in the study of staphylococcal toxins analyzed in food matrices. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 1052–1060, 1 nov. 2013.

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.

WANG, S.C.; WU, C.M.; XIA, S.C.; QI, Y.H.; XIA, L.N.; SHEN, J.Z. Distribution of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from milk samples of bovine

subclinical mastitis cases in two major dairy production regions of China. **Veterinary Microbiology**, v. 137, p. 276-281, 2009.

ZENG, J. et al. Distribution of *Salmonella* Enteritidis in internal organs and variation of cecum microbiota in chicken after oral challenge. **Microbial Pathogenesis**, v. 122, p. 174–179, 1 set. 2018.

Esse trabalho resultou na publicação do artigo “QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS DA CULINÁRIA JAPONESA VENDIDOS EM RESTAURANTES EM BOTUCATU, SP” na revista Higiene Alimentar, 35 (293): e1059, 2021. DOI 10.37585/HA2021.02culinaria.