



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS**

**MONIZI COSTA AIRES**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE SALMÃO (*Sashimi*)  
COMERCIALIZADO EM RESTAURANTES ESPECIALIZADOS NA CULINÁRIA  
JAPONESA DA CIDADE DE MACAPÁ, AMAPÁ**

**MACAPÁ/AP  
2019**

**MONIZI COSTA AIRES**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE SALMÃO (*Sashimi*)  
COMERCIALIZADO EM RESTAURANTES ESPECIALIZADOS NA CULINÁRIA  
JAPONESA DA CIDADE DE MACAPÁ, AMAPÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na área de concentração Ensaio Biológicos, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Sá de Oliveira  
Co-Orientadora: Profa. Dra. Elza Caroline Muller

**MACAPÁ/AP  
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá  
Elaborada por Orinete Costa Souza – CRB-2/1709

---

Aires, Monizi Costa.

Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de salmão (*Sashimi*) comercializado em restaurantes especializados na culinária japonesa da cidade de Macapá, Amapá / Monizi Costa Aires; Orientador, Júlio César Sá de Oliveira; Coorientadora, Elza Caroline Muller. – Macapá, 2019.

49 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

1. Alimentos – Manuseio \_ Medidas de segurança. 2. *Listeria monocytogenes*. 3. *Salmonella* spp. 4. Microbiologia. 5. Saúde pública. I. Oliveira, Júlio César Sá de, orientador. II. Muller, Elza Caroline, coorientadora. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

664.001579 A298a  
CDD. 22 ed.

---

**MONIZI COSTA AIRES**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE SALMÃO (*Sashimi*)  
COMERCIALIZADO EM RESTAURANTES ESPECIALIZADOS NA CULINÁRIA  
JAPONESA DA CIDADE DE MACAPÁ, AMAPÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na área de concentração Ensaio Biológicos, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

DATA DE APROVAÇÃO: 13/06/2019

*Elza Caroline Alves Müller*

---

Co-Orientadora/Presidente: Profa. Dra. Elza Caroline Alves Muller  
Universidade Federal do Amapá – UNIFAP

*Amanda Alves Fecury*

---

Examinadora: Profa. Dra. Amanda Alves Fecury  
Universidade Federal do Amapá – UNIFAP

*Rafael Lima Resque*

---

Examinador: Prof. Dr. Rafael Lima Resque  
Universidade Federal do Amapá – UNIFAP

*Lilian Grace da Silva Solon*

---

Examinadora Externa: Profa. Dra. Lílian Grace da Silva Solon  
Universidade Federal do Amapá – UNIFAP

**MACAPÁ/AP  
2019**

*Dedico este trabalho aos meus pais Fernando Aires e Maria do Socorro, que mesmo com todas as dificuldades, não mediram esforços para a realização desse sonho. Agradeço por todo carinho, incentivo e amor incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, por ser minha força e meu consolo nos momentos que desanimei, pois ter fé em Deus é uma dádiva que nos empurra para as maiores conquistas da nossa vida, não há obstáculos que você não consiga vencer quando crê na vitória.

À toda minha família, em especial aos meus pais (Fernando Aires e Maria do Socorro) por serem exemplos de fé, luta e amor, que mesmo sem estudos, sempre me incentivaram a permanecer nesse caminho e a nunca desistir. Obrigada por todos os ensinamentos, jamais conseguirei descrever todo amor e gratidão que sinto por vocês.

Ao Weksiley Alves, amigo, parceiro e namorado, por todo amor, incentivo, paciência e compreensão. Obrigada por estar ao meu lado nos momentos que mais precisei, ouviu atento as minhas angústias e sempre me encorajou a continuar, conduzindo-me para que eu não esmorecesse nos momentos de maior fragilidade. Com você ao meu lado a caminhada tornou-se mais fácil, pois qualquer pessoa que te motiva a ser melhor é alguém que vale a pena ter por perto.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Júlio César Sá pela oportunidade, idealização e orientação da pesquisa.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Elza Caroline Muller, com suas orientações sempre muito paciente e qualificada, foi chave fundamental para a conclusão desta pesquisa. Minha eterna gratidão e admiração por todo apoio, incentivo e palavra amiga oferecida.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Amanda Fecury, Prof. Dra. Lílian Solon e Prof. Dr. Rafael Resque, pela disponibilidade e contribuição com este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação de Ciências da Saúde (PPGCS) pela oportunidade de cursar o mestrado, junto com a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa que possibilitou a minha permanência até o fim do curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amapá (FAPEAP) e ao Ministério da Saúde pelo suporte financeiro a esta pesquisa, através do edital Chamada Pública FAPEAP nº 003/2016 – Programa de Pesquisa para o SUS/PPSUS.

Aos colegas do Laboratório de Limnologia e Ictiologia (LABILIMNO) da Universidade Federal do Amapá, por toda ajuda e companheirismo, em particular ao Prof. Me. Rafael Espíndola do Nascimento, por todos os ensinamentos teóricos e práticos transmitidos durante este trabalho.

Ao Laboratório Central de Saúde Pública do Amapá (LACEN), em particular ao Farmacêutico Otávio Eutíquio Vasconcelos pela colaboração incondicional nas produções dos reagentes e meios de cultura.

À equipe do departamento de Vigilância Sanitária Municipal de Macapá, em particular a diretora da Divisão de Fiscalização e Controle de Alimentos Martiana Barros, pelo apoio logístico na coleta das amostras.

Aos verdadeiros amigos que ocupam um lugar especial em minha vida, obrigada por sempre torcerem e vibrarem em cada sonho realizado.

Aos meus colegas de turma (PPGCS/2017), que sempre se fizeram presentes. Cada um teve um papel fundamental durante essa jornada. Meu voto de sucesso e sinceros agradecimentos.

À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho, meu muito obrigado, que Deus os abençoe infinitamente.

**Gratidão!**

*“Pense nos seus sonhos e nas suas ideias como pequenas máquinas milagrosas dentro de você que ninguém mais pode tocar. Quanto mais fé você deposita nelas, mais altas elas ficam, até que um dia elas se erguerão e levarão você junto.”*

*“Se você quer chegar lá, tudo o que precisa fazer é tentar.”*

**William Kamkwamba**  
*O menino que descobriu o vento*



## RESUMO

A ingestão de alimentos contaminados por microrganismos podem causar diversas doenças e constituem um grave problema de saúde pública. O pescado é um dos principais alimentos que serve de veículo na transmissão de agentes patogênicos, destacando-se *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp., que é apresentado como o principal responsável por óbitos relacionados com doenças transmitidas por alimentos, e como o agente bacteriano mais envolvido nos surtos alimentares, respectivamente. O objetivo deste estudo foi avaliar as características microbiológicas e higiênico-sanitárias do salmão (*sashimi*) comercializado em restaurantes especializados na culinária japonesa da cidade de Macapá, Amapá. Foram coletadas 20 amostras em duplicatas provenientes de 10 restaurantes e submetidas a protocolos microbiológicos com base na Instrução Normativa nº 40, de 16 de dezembro de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para identificação de *Listeria monocytogenes*, e conforme o Manual de Métodos de Análises Microbiológicas de Alimentos para o isolamento de *Salmonella* spp. Os parâmetros higiênico-sanitários em menor conformidade foram descritos de acordo com a lista de verificação padrão da vigilância sanitária municipal e a temperatura das amostras mensuradas utilizando termômetro digital com mira infravermelha. Do total de amostras analisadas, nenhuma apresentou contaminação por *Listeria monocytogenes*. Já *Salmonella* spp. foi isolada em amostras de quatro (40%) restaurantes. A categoria que apresentou itens em menor conformidade foram os parâmetros higiênico-sanitários associados aos manipuladores, destacando-se o aspecto da higienização das mãos e o risco de contaminação cruzada insatisfatório em 100% dos restaurantes avaliados. Os valores referentes à temperatura das amostras variaram de 1.0 a 22°C, em que 80% das amostras apresentaram valores acima dos recomendados pela legislação brasileira ( $\leq 5^{\circ}\text{C}$ ). Estes resultados evidenciam que as amostras analisadas representam risco à saúde do consumidor, comprometendo a segurança alimentar e nutricional, considerando a associação de parâmetros higiênico-sanitários insatisfatórios de manipuladores, temperatura inadequada e isolamento de *Salmonella* spp. Portanto, a aplicação de boas práticas de manipulação nesse tipo de estabelecimento torna-se fundamental para evitar doenças e transtornos de origem alimentar.

**Palavras-chave:** Segurança de alimentos. *Listeria monocytogenes*. *Salmonella* spp. Microbiologia. Saúde pública.

## ABSTRACT

Ingestion of food contaminated by micro-organisms causes various diseases and constitutes a serious public health problem. Fish is one of the main foods that serves as a vehicle for the transmission of pathogen agents, especially *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp., which is presented as the main cause of death related to foodborne diseases, and as the most involved bacterial agent in food outbreaks, respectively. The objective of this study was to evaluate the microbiological and hygienic-sanitary characteristics of salmon (*sashimi*) commercialized in specialized restaurants in the Japanese cuisine of the city of Macapá, Amapá. 20 samples were collected in duplicate from 10 restaurants and submitted to microbiological protocols based on Normative Instruction No. 40, dated December 16, 2005, from the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply, to identify *Listeria monocytogenes*, and according to the Manual of Methods of Microbiological Food Analysis for the isolation of *Salmonella* spp. The hygienic-sanitary parameters in less compliance were according to the standard list of municipal sanitary inspection and the temperature of the samples measured by thermometer digital with infra-red scope. Of the total samples analyzed, none presented contamination by *Listeria monocytogenes*. However, *Salmonella* spp. was isolated in samples of four (40%) of the restaurants. The category that presents items in less conformity were the hygienic-sanitary parameters associated to the manipulators, highlighting the hand hygiene aspect and the risk of unsatisfactory cross-contamination in 100% of the evaluated restaurants. Sample temperature values varied from 1.0 to 22°C, in which 80% of the samples had values higher than those recommended by Brazilian legislation ( $\leq 5^{\circ}\text{C}$ ). These results show that the analyzed samples represent a risk to the health of the consumer, compromising their food and nutritional security, considering the association of unsatisfactory hygienic-sanitary parameters of manipulators, inadequate temperature and isolation of *Salmonella* spp. Therefore, the application of good practices of handling in this type of establishment becomes fundamental to avoid diseases and disorders of alimentary origin.

**Keywords:** Food safety. *Listeria monocytogenes*. *Salmonella* spp. Microbiology. Public health.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Fluxograma das etapas de identificação de *Listeria monocytogenes* pelo método microbiológico convencional, com base na Instrução Normativa nº 40, de 16 de dezembro de 2005 (BRASIL, 2005), e metodologia descrita por Palma et al. (2016). .....23
- Figura 2-** Fluxograma das etapas para de identificação de *Salmonella* spp. pelo método microbiológico convencional, com base no Manual de Métodos de Análises Microbiológicas de Alimentos e metodologia descrita por Santos, 2006. ....25
- Figura 3-** Comparação entre a temperatura mensurada, temperatura ideal recomendada e temperatura máxima aceitável conforme RDC nº 216 de 15 de setembro de 2004 da ANVISA. ....35

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Composição dos suplementos de Caldo Fraser, Ágar Oxford e Ágar Palcam utilizados no cultivo bacteriano de *Listeria monocytogenes*. .....24
- Tabela 2-** Distribuição das conformidades e não conformidades das amostras de salmão (*Sashimi*), comercializadas em restaurantes especializados na culinária japonesa da cidade de Macapá, Amapá, quanto aos padrões microbiológicos analisados. ....28
- Tabela 3-** Itens da Lista de Verificação da Vigilância Sanitária Municipal associados à categoria manipuladores, que apresentara menor conformidade nos restaurantes especializados na culinária japonesa da cidade de Macapá, Amapá. ....32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>BS</b>	Bismuto-Sulfito
<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<b>DTAs</b>	Doenças Transmitidas por Alimentos
<b>EPM</b>	Escola Paulista de Medicina
<b>LABILIMNO</b>	Laboratório de Limnologia e Ictiologia
<b>LACEN</b>	Laboratório Central de Saúde Pública do Amapá
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>MILi</b>	Motilidade; Indol; Lisina
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PMM</b>	Prefeitura Municipal de Macapá
<b>RDC</b>	Resolução de Diretoria Colegiada
<b>SINAM</b>	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
<b>SS</b>	Salmonella-Shigella
<b>SVS</b>	Superintendência da Vigilância em Saúde
<b>TSI</b>	Tríplice Açúcar Ferro
<b>UNIFAP</b>	Universidade Federal do Amapá
<b>UVM</b>	Universidade de Vermont Modificado

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO .....	14
<b>1.1.1 Doença Transmitida por Alimentos (DTAs) .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1.2 Contaminação em Alimentos de Origem Animal .....</b>	<b>16</b>
1.1.2.1 Pescado .....	16
<b>1.1.3 Agentes Patogênicos em Alimentos .....</b>	<b>17</b>
1.1.3.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	17
1.1.3.2 <i>Salmonella</i> spp.....	18
<b>1.1.4 Método de Identificação de Agentes Patogênicos em Alimentos.....</b>	<b>19</b>
1.1.4.1 Método Microbiológico Convencional.....	19
<b>1.1.5 Vigilância Sanitária e Segurança de Alimentos .....</b>	<b>20</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
2.1 GERAL.....	21
2.2 ESPECÍFICOS.....	21
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
3.1 AMOSTRAGEM.....	22
3.2 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS POR MÉTODO MICROBIOLÓGICO.....	22
<b>3.2.1 Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.2 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....</b>	<b>25</b>
3.3 TABULAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS .....	26
<b>3.3.1 Padrões Microbiológicos .....</b>	<b>27</b>
<b>3.3.2 Lista de Verificação .....</b>	<b>27</b>
<b>3.3.3 Termo de Coleta de Amostra.....</b>	<b>27</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
4.1 ISOLAMENTO MICROBIOLÓGICO .....	28
<b>4.1.1 Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1.2 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....</b>	<b>30</b>
4.2 PARÂMETROS HIGIÊNICO-SANITÁRIOS.....	32
4.3 TEMPERATURA DAS AMOSTRAS .....	34
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXO A – LISTA DE VERIFICAÇÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXO B – TERMO DE COLETA DE AMOSTRA.....</b>	<b>47</b>
<b>ANEXO C – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO .....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) são ocorrências clínicas, caracterizadas como doenças de natureza tóxica ou infecciosa, causadas por microrganismos patogênicos provenientes da ingestão de alimento ou água contaminada. Constituem um grave problema de saúde pública em nível mundial, cujas manifestações clínicas dependem principalmente do agente etiológico envolvido, podendo variar desde leves sinais gastrointestinais, até casos mais graves como insuficiência renal aguda e insuficiência respiratória (OLIVEIRA et al., 2011; GARCIA, DUARTE, 2014; BRASIL, 2018).

Dentre as DTAs mais frequentes, as que são veiculadas pela ingestão de pescado contaminado figuram entre as dez mais importantes clinicamente (BRASIL, 2018; OMS, 2018). Há milênios, o pescado vem sendo utilizado pelo homem como forma de subsistência, porém maior interesse foi atribuído após a expansão do conhecimento na área da nutrição, que apresentou sua grande importância na alimentação humana, por se tratar de um produto altamente proteico, com excelente valor nutricional e características peculiares, como por exemplo, a presença de altos teores de vitamina A e D, cálcio, ômega-3, fósforo e qualidade dos lipídios. Características essas que podem proteger contra vários efeitos adversos para a saúde, incluindo a mortalidade por doença coronária e acidente vascular cerebral (NEIVA, 2010; PIENIAK et al., 2010; BORGHESI et al., 2013).

Entretanto, a sua qualidade deve ser mantida, em virtude de o pescado ser um alimento altamente perecível, de fácil deterioração devido a sua composição química. Uma vez manipulado, armazenado e transportado sem os cuidados sanitários necessários, criam condições que favorecem o desenvolvimento de agentes patogênicos, presentes no próprio pescado ou do ambiente, podendo causar infecções humanas graves, destacando-se as toxinfecções bacterianas (FERREIRA et al., 2014). O pescado pode ser contaminado com o mais amplo e variado grupo de microrganismos. Entre os grupos bacterianos, o gênero *Salmonella* é reportado como o agente bacteriano mais envolvido nos surtos alimentares, enquanto, *Listeria monocytogenes* é registrada como a principal responsável pelos óbitos relacionados com DTAs (OLIVEIRA et al., 2011; BRASIL, 2018).

Dentro dessa perspectiva, torna-se essencial o controle e fiscalização de estabelecimentos que ofertam pescado, em especial cru, pois esse tipo de alimento apresenta elevado risco para à saúde do consumidor, devido ao fato de serem consumidos sem tratamento térmico e também pelos aspectos higiênico-sanitários envolvidos na sua preparação. Logo, a identificação e isolamento de agentes patógenos em alimentos revestem-

se da principal estratégia para que medidas corretivas possam ser adotadas (SANTIAGO et al., 2013). Para isso, a microbiologia convencional é a técnica mais utilizada, seguindo protocolos padronizados, a exemplo de métodos de cultura bacteriana, que promove a multiplicação em colônias de organismos microbianos *in vitro*, permitindo o estudo das características específicas do microrganismo isolado (JAY, 2005; ROHDE et al., 2015).

Considerando as consequências que agentes patogênicos associados ao consumo de pescado cru podem acarretar à saúde e a indisponibilidade de informações epidemiológicas na cidade de Macapá sobre a qualidade microbiológica do alimento em questão, o objetivo deste estudo foi avaliar os aspectos microbiológicos e higiênico-sanitários do salmão (*Sashimi*) comercializado em restaurantes especializados na culinária japonesa da cidade de Macapá, Amapá, por meio da pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.*

## 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1.1 Doença Transmitida por Alimentos (DTAs)

As DTAs abrangem enfermidades do mais amplo espectro, podendo ser causadas por bactérias, vírus, parasitas, toxinas, príons, agrotóxicos, substâncias químicas e metais pesados. Essa contaminação pode ocorrer em qualquer fase do processo de produção até o consumo, principalmente através do meio ambiente, incluindo a poluição da água, solo ou ar (SILVA JÚNIOR, 2002; AMSON, HARACEMIV, MASSON, 2006; BRASIL, 2018).

A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2018) descreve aproximadamente 250 tipos de doenças alimentares, e estima que, a cada ano, causem o adoecimento de uma a cada 10 pessoas e 33 milhões de óbitos. Além disso, DTAs podem ser fatais, especialmente em crianças menores de 5 anos, causando 420 mil mortes. Na região das Américas, as doenças diarreicas são responsáveis por 95% das DTAs. O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos, estima que a cada ano cerca de 1 em cada 6 americanos (ou 48 milhões de pessoas) fica doente, 128 mil são hospitalizados e 3.000 morrem por consumo de alimentos contaminados, sendo a *Salmonella*, *Listeria* e o *Toxoplasma* os principais agentes responsáveis por 1.500 óbitos anuais (OLIVEIRA et al., 2011; GARCIA, DUARTE, 2014).

No Brasil, de acordo com dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), são notificados em média, por ano, 700 surtos de DTAs, com envolvimento de 13 mil doentes e 10 óbitos (BRASIL, 2018; OMS, 2018). No entanto, o perfil epidemiológico



das DTAs no Brasil ainda é pouco conhecido, uma vez que a maioria dos casos não são notificados, pois muitos agentes etiológicos causam sintomas brandos, fazendo com que o paciente não procure assistência médica. Em decorrência disso, somente alguns Estados dispõem de estatísticas e dados sobre os agentes etiológicos mais comuns, alimentos frequentemente envolvidos na contaminação, população de maior risco e fatores contribuintes (SANTOS, 2006; AMSON, HARACEMIV, MASSON, 2006; GARCIA, DUARTE, 2014).

Vários são os fatores que contribuem para o aparecimento dessas doenças, entre os quais destacam-se: o crescimento populacional; a existência de grupos vulneráveis; o processo de urbanização desordenado; a produção e o consumo de alimentos em condições inadequadas, além do deficiente controle dos órgãos públicos e privados na qualidade dos alimentos ofertados para o consumo da população (OLIVEIRA et al., 2011; BRASIL, 2018).

Acrescentam-se outros determinantes para o aumento na incidência das DTAs, tais como a maior exposição das populações a alimentos destinados ao pronto consumo coletivo (*fast-foods*), o consumo de alimentos em vias públicas, a utilização de novas modalidades de produção, o aumento no uso de aditivos e a mudanças de hábitos alimentares, sem deixar de considerar as mudanças ambientais, a globalização e as facilidades atuais de deslocamento da população, inclusive em nível internacional (OLIVEIRA et al., 2011; AMAGLIANI et al., 2012).

Um surto de DTAs é definido como um incidente em que duas ou mais pessoas apresentam os mesmos sinais/sintomas após a ingestão de alimentos e/ou água da mesma origem. Boa parte dos surtos alimentares são resultados da manipulação, conservação e distribuição inadequada (AMSON, HARACEMIV, MASSON, 2006; BRASIL, 2018). A identificação de casos suspeitos de DTAs que possam caracterizar um surto são objetos de interesse da vigilância sanitária, que deve ser acionada para realizar a investigação, com o objetivo de identificar o alimento responsável, o agente etiológico envolvido, os fatores que determinaram o aparecimento do surto e o quadro clínico predominante, bem como adotar medidas de controle precocemente, evitando danos maiores à saúde da comunidade (GERMANO, GERMANO, 2011; BRASIL, 2018).

A maioria dos surtos tem sido relacionada à ingestão de alimentos sem qualquer alteração organoléptica visível, ou seja, com boa aparência, sabor e odor normais. Isso ocorre porque a dose infectante de patógenos alimentares geralmente é menor que a quantidade de microrganismos necessária para degradar os alimentos. Por outro lado, alimentos com características organolépticas alteradas dificilmente causam surtos alimentares, uma vez que não são consumidos devido à sensação repulsiva que causam aos consumidores. Nesse

sentido, a identificação e investigação de surtos causados por alimentos é um componente essencial na prevenção e no controle das DTAs. Surtos sem esclarecimento etiológico geralmente têm como causas a notificação tardia, a ausência de coleta de amostras clínicas e/ou de alimentos em tempo oportuno, ou testes laboratoriais inadequados (WELKER et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; GARCIA, DUARTE, 2014).

## **1.1.2 Contaminação em Alimentos de Origem Animal**

### **1.1.2.1 Pescado**

O pescado é um alimento de grande importância na dieta de inúmeros grupos populacionais, pois é fonte de proteína de alto valor biológico, vitaminas A e D, lipídios de excelente qualidade e baixo teor de colesterol. Apresentam ainda alta digestibilidade e os valores encontrados para a vitamina A, cálcio e fósforo são superiores na carne de peixe, quando comparados com a carne bovina e de frango. Apesar de toda a importância nutricional, quando não observadas às boas práticas de manipulação, conservação e transporte, o pescado, torna-se um dos principais alimentos de origem animal veículo na transmissão de doenças (VILA NOVA, GODOY, ALDRIGUE, 2005; NEIVA, 2010; FAO, 2018).

Em meio aos peixes, existe o salmão, conhecido cientificamente como Salmonídeos, pertencente à classe dos teleósteos, da família Salmonidae e da ordem dos Salmoniformes, usado como base na culinária japonesa, tornou-se popular entre os brasileiros. Corresponde a um alimento nutricionalmente saudável em termos de composição centesimal e de ácidos graxos, podendo ser consumido em uma dieta saudável com alto teor proteico e elevado teor de ácidos graxos essenciais (TONIAL et al., 2010; MONTANARI et al., 2015).

Baseada no consumo de alimentos crus, especialmente os peixes, uma de suas especialidades é o *sashimi* de salmão, que são fatias finas do peixe livre de qualquer tipo de cocção, desta forma dita, *in natura*. Esta iguaria é um alimento considerado de alto risco, por se tratar de um alimento de fácil contaminação microbiana, devido sua composição corporal e a riqueza de nutrientes, que servem de substrato para a instalação de microrganismos (VALLANDRO et al., 2011; MONTANARI et al., 2015).

As doenças transmitidas pelo pescado podem ser amplamente divididas em intoxicações e infecções. No primeiro caso, o agente causador é um composto tóxico que contamina o alimento ou é produzido por um agente biológico presente no pescado. Se o

agente for biológico, a intoxicação irá ocorrer mesmo se o agente estiver morto, desde que tenha produzido previamente toxinas suficientes para ativar os sintomas da enfermidade. No caso das infecções, o agente causador (bactérias, vírus ou parasitas) tem que ser ingerido vivo. Este depois invade a membrana mucosa intestinal ou outros órgãos, causando infecção ou ocasiona as toxinfecções alimentares (FERREIRA et al., 2014; FAO, 2018).

A contaminação pós-captura pode ocorrer nas seguintes circunstâncias: nos porões dos barcos pesqueiros sem condições de higiene; durante o trajeto para o porto, em contato com gelo produzido a partir de água de má qualidade; no cais do entreposto quando lavado com água proveniente dos canais contaminados com matéria orgânica; nos caminhões mal refrigerados durante o transporte do porto para as fábricas ou armazéns distribuidores e, em toda a malha de distribuição até alcançar o comércio varejista ou o domicílio do consumidor. Em todas essas etapas a refrigeração é de fundamental importância para a conservação do pescado, ao lado da higiene das instalações e qualidade da água (SANTOS, 2006; FERREIRA et al., 2014).

### **1.1.3 Agentes Patogênicos em Alimentos**

#### *1.1.3.1 Listeria monocytogenes*

Dentre as bactérias identificadas como causadoras de infecções alimentares, destaca-se a *Listeria monocytogenes*, sendo a primeira espécie reconhecida do gênero *Listeria*. No entanto, atualmente são consideradas oito espécies: *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii* são patogênicas para o homem e/ou animais; *Listeria seeligeri* é avirulenta; *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria grayi*, *Listeria marthii* e *Listeria rocourtiae* são saprófitas (JEYALETCHUMI et al., 2010; ALMEIDA, 2014; BYRNE, 2014).

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria gram-positiva, resistente, tolerante ao sal, encontrada em unidade individual ou em cadeias curtas, que não produzem esporos. Apresenta temperatura favorável para o seu crescimento entre 30°C a 37°C, no entanto, o patógeno é capaz de desenvolver-se em temperaturas de refrigeração a 4°C. É uma bactéria onipresente no ambiente, podendo ser encontrada em ambientes úmidos, solo e vegetação em decomposição (GARRIDO et al., 2010; JEYALETCHUMI et al., 2010). Multiplica-se em pH entre 5,0 e 9,0, com crescimento ótimo em pH 7,0 e 7,5. É termolábil, podendo perder suas propriedades durante o cozimento. Temperaturas altas em torno de 71,7°C, utilizada para pasteurização do leite, por exemplo, podem inativar este microrganismo (CRUZ et al., 2012).

Listeriose é a denominação de um grupo geral de desordens causadas pela *L. monocytogenes* que incluem septicemia, meningite, encefalite, infecção cervical ou intrauterina em gestantes, as quais podem provocar aborto (no segundo ou terceiro trimestre) ou nascimento prematuro, com um valor aproximado de 20% de taxa de letalidade. No entanto, em grupos de alto risco, como mulheres grávidas, idosos e adultos imunocomprometidos a taxa de letalidade aumenta para até 75% (PARIHAR et al., 2008; FRETZ et al., 2009).

Outros danos podem ocorrer como endocardite, lesões granulomatosas no fígado e outros órgãos, abscessos internos ou externos e lesão cutânea papular ou pustular, essas desordens comumente são precedidas por sintomas semelhantes a um simples resfriado com febre persistente. Sintomas gastrointestinais como náusea, vômitos e diarreia, podem preceder ou acompanhar as manifestações mais graves da doença (SILVA, JUNQUEIRA, SILVEIRA, 2007; CRUZ et al., 2012; BYRNE, 2014).

#### 1.1.3.2 *Salmonella* spp.

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família Enterobacteriaceae, constituída por mais 2.000 sorovares, sendo praticamente todos potencialmente patogênicos. Estes organismos mesófilos estão distribuídos geograficamente por todo o mundo, mas ocorrem, principalmente, nos intestinos do homem e dos animais e em ambientes poluídos com excrementos humanos ou animais (FRANCO, LANDGRAF, 2004; MARTINS, 2006).

São bastonetes gram-negativos, móveis, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos. A sobrevivência na água depende de muitos parâmetros, tais como fatores biológicos (interação com outras bactérias) e físicos (temperatura). Esses organismos multiplicam-se em temperaturas na faixa de 7 a 49°C, com valor ideal de 37°C, e podem ser mantidos sob temperatura de 60°C por 15 a 20 minutos. A faixa de pH para sua multiplicação está entre 4,0 e 9,0, tendo 7,0 como valor ideal (KUMAR et al., 2003; FORSHELL, WIERUP, 2006).

Dentre as espécies mais virulentas, destacam-se a *Salmonella typhi* e *Salmonella paratyphi*, causadoras das febres tifoides e paratifoides, respectivamente. A espécie *Salmonella typhimurium* é considerada uma das principais bactérias causadoras de uma doença gastrointestinal conhecida como salmonelose, que é caracterizada por sintomas de diarreia, febre, dores abdominais e vômitos. Esses sinais clínicos aparecem, normalmente, de 12 a 36 horas após o contato com o microrganismo e duram de um a quatro dias (FRANCO, LANDGRAF, 2004; FORSHELL, WIERUP, 2006).

Sorovares do gênero *Salmonella* são ubíquos e estão amplamente distribuídos no meio ambiente. Neste sentido, condições climáticas e outros fatores ambientais desempenham um papel significativo na incidência de *Salmonella* em vários nichos ecológicos, tanto podendo afetar sua capacidade de persistir na natureza, quanto evidenciando sua capacidade em adquirir multirresistência. Entretanto, outras formas de ocorrência de salmonelose estão relacionadas ao aumento da escala industrial de processamento de alimentos, aumento do número de restaurantes *fast-food* e mudanças nos hábitos alimentares (KUMAR et al., 2003; FORSHELL, WIERUP, 2006; ABULREESHIN, 2012).

#### **1.1.4 Método de Identificação de Agentes Patogênicos em Alimentos**

##### **1.1.4.1 Método Microbiológico Convencional**

Atualmente, existe uma variedade de métodos convencionais disponíveis para a detecção de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. em amostras de alimentos. As técnicas tradicionais de análise microbiológicas de alimentos baseiam-se no emprego de testes morfológicos e bioquímicos para tipagem, subtipagem e identificação de gêneros, espécies e subespécies microbianas. As técnicas microbiológicas mais comumente utilizadas são realizadas em meios de cultura não seletivos e seletivos complementadas por testes bioquímicos diferenciais, na sua maioria, de produção enzimática, usados em conjunto com testes sorológicos (FREITAS, LEMOS, MARIN, 2006).

Dessa forma, as técnicas de cultura, por exemplo, são mundialmente reconhecidas como método padrão para a detecção de patógenos bacterianos em amostras de alimentos. Em tese, estes métodos são capazes de detectar uma única célula viável em uma amostra de alimento seguindo os estágios de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo. Nesse sentido, os métodos microbiológicos convencionais são importantes, pois seu uso resulta em uma cultura pura do organismo, tornando-se útil para fins de fiscalização e controle de surtos epidemiológicos (ANDREWS, 2002; DICKEL et al., 2005).

No entanto, um grande desafio para o controle das contaminações por patógenos associados a alimentos é o seu diagnóstico rápido e preciso. Apesar da técnica de análise microbiológica convencional ser ainda a mais utilizada para a detecção de patógenos bacterianos em alimentos no Brasil, a mesma é constituída por protocolos demorados; que podem ocupar entre cinco à sete dias; e trabalhosos, devido à necessidade de muitos reagentes e vidrarias. Nesse sentido, a técnica apesar de confiável, se mostra pouco prática e eficiente,

uma vez que sua sensibilidade e especificidade têm sido questionadas, devido às grandes variações bioquímicas e mutações genéticas que os microrganismos podem apresentar (DICKEL et al., 2005; FREITAS, LEMOS, MARIN, 2006; ROHDE et al., 2015).

### **1.1.5 Vigilância Sanitária e Segurança de Alimentos**

A higiene e a fiscalização dos alimentos constituem um campo fundamental da saúde pública, que estuda os processos de conservação dos produtos alimentícios e as alterações, adulterações e falsificações que eles podem sofrer, tanto *in natura* quanto depois de preparados, e estabelece normas práticas de apreciação e vigilância (MARINS et al., 2014). Com o propósito de proteger o consumidor contra a ingestão de alimentos nocivos, os países vêm ao longo da história, buscando mecanismos organizacionais e a instrumentalização das ações em saúde pública propiciando uma modernização nos procedimentos de Vigilância Sanitária, fazendo com que a fiscalização dos alimentos tenha se tornado mais eficaz e objetiva no controle dos principais pontos críticos. A legislação também provocou adequação nos procedimentos de manipulação das indústrias e dos estabelecimentos que preparam e servem alimentos, promovendo alterações técnicas para tornar a manipulação dos alimentos mais segura do ponto de vista higiênico-sanitário (VALLANDRO et al., 2011).

No Brasil, a implantação da legislação de proteção à saúde, relacionada à segurança alimentar, é designada a Vigilância Sanitária. Definida como um conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde. Os órgãos de vigilância sanitária tem como função fiscalizar, licenciar e cadastrar os estabelecimentos que produzem, comercializam, distribuem e/ou armazenam alimentos; bem como a fiscalização do transporte dos produtos alimentícios (GERMANO, GERMANO, 2011; MARINS et al., 2014).

A segurança de alimentos é um desafio atual e visa à oferta de alimentos livres de agentes que podem por em risco à saúde do consumidor. Assim, a fiscalização da qualidade dos alimentos, no sentido de verificar padrões microbiológicos, detectar microrganismos patogênicos ou até mesmo a origem de uma contaminação, devem ser feitas não só no produto final, mas em todas as etapas da produção, desde o abate ou a colheita, passando pelo transporte, armazenamento e processamento, até a distribuição final ao consumidor (SILVA JÚNIOR, 2002; ALMEIDA, 2014).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar as características microbiológicas e higiênico-sanitárias do salmão (*Sashimi*), comercializado em restaurantes especializados na culinária japonesa da cidade de Macapá, Amapá.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Pesquisar a ocorrência de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. por método microbiológico convencional;
- Descrever os parâmetros higiênico-sanitários em menor conformidade nos restaurantes de acordo com a lista de verificação padrão da vigilância sanitária municipal;
- Mensurar a temperatura de exposição das amostras de salmão (*Sashimi*);
- Estabelecer os riscos do consumo de salmão (*Sashimi*) com base nos parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAGEM

O presente estudo trata-se de uma amostragem não probabilística por conveniência, em que foram analisadas 20 amostras em duplicatas de pescado do tipo salmão (*Sashimi*), coletadas em 10 restaurantes especializados na culinária japonesa da cidade de Macapá, Amapá, selecionados principalmente dos bairros centrais da cidade, tendo em vista que existe uma maior concentração desses estabelecimentos nessa região.

As coletas foram realizadas durante os meses de Julho a Outubro de 2018, sempre acompanhadas por um Fiscal de Saúde Pública da Vigilância Sanitária Municipal de Macapá, onde em cada estabelecimento realizou-se procedimento de fiscalização padrão da vigilância, com aplicação da Lista de verificação - notificação conforme RCD nº 2016/2004-ANVISA e lei complementar nº 052/2008-PMM (ANEXO A), bem como preenchimento do termo de coleta de amostra (ANEXO B).

No momento da coleta foram aferidas as temperaturas de exposição das amostras utilizando um termômetro digital com mira infravermelha (STKTI-550®). Após coletadas, as amostras foram imediatamente armazenadas em sacos polietileno de baixa densidade com fechos herméticos, devidamente identificados, e transportados em recipientes isotérmicos portáteis com gelo reciclável, de forma a conservar a temperatura de exposição, até o Laboratório de Limnologia e Ictiologia (LABILIMNO) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) para a realização das análises.

#### 3.2 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS POR MÉTODO MICROBIOLÓGICO CONVENCIONAL

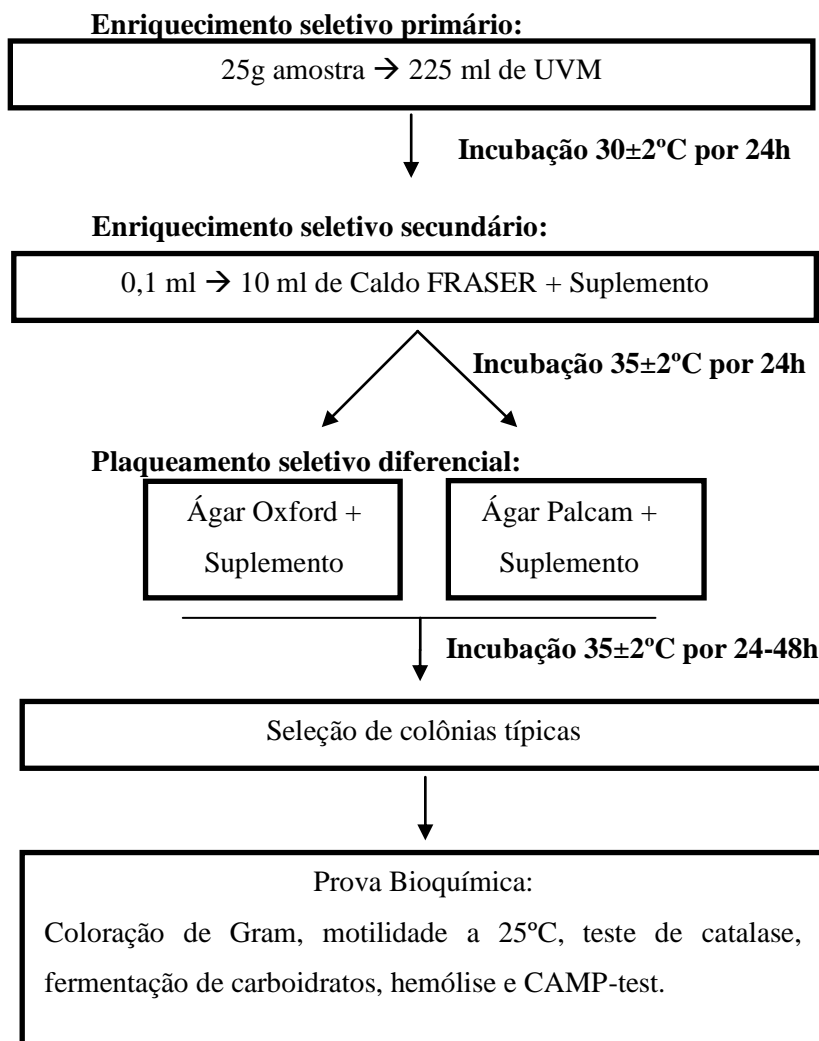
Os meios de cultura utilizados foram produzidos no Laboratório Central de Saúde Pública do Amapá (LACEN), atual Superintendência da Vigilância em Saúde (SVS), conforme as orientações do fabricante, que inclui etapas de pesagem, dissolução, esterilização, distribuição e teste de esterilidade, após o preparo foram armazenadas na geladeira a 4 °C até sua utilização, levando-se em consideração a validade de cada meio depois de produzido.



### 3.2.1 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

As análises microbiológicas para o isolamento e identificação de *Listeria*, foram realizadas com base na Instrução Normativa nº 40, de 16 de dezembro de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2005), bem como metodologia descrita por Palma et al. (2016), a qual inclui uma etapa de enriquecimento seletivo primário, enriquecimento seletivo secundário, plaqueamento seletivo e confirmação bioquímica (Figura 1).

**Figura 1-** Fluxograma das etapas de identificação de *Listeria monocytogenes* pelo método microbiológico convencional, com base na Instrução Normativa nº 40, de 16 de dezembro de 2005 (BRASIL, 2005), e metodologia descrita por Palma et al. (2016).



Fonte: Autoria própria, 2019.

Inicialmente, no interior de uma cabine de segurança biológica pesou-se 25g da amostra obtida em pequenas frações de diversos pontos de cada unidade amostral (*pool* da amostra) adicionada, posteriormente, em garrafa de vidro contendo 225 ml de caldo para enriquecimento primário da Universidade de Vermont Modificado – UVM (Neogen, Acumedia®) e incubado em estufa para cultura bacteriológica (Logen Scientific®) a uma temperatura de  $30 \pm 2$  °C por 24 horas.

O caldo UVM pré-incubado foi utilizado para o enriquecimento secundário, inoculado com o auxílio de uma pipeta estéril 0,1 ml para um tubo de ensaio contendo 10 ml de Caldo Fraser (Neogen, Acumedia®), adicionado de seu suplemento 7984 (Neogen, Acumedia®) (Tabela 1) e incubado a  $35 \pm 2$  °C por 24h. Quando observada a ocorrência de escurecimento no caldo Fraser, devido à reação de hidrólise da esculina, as amostras foram submetidas ao plaqueamento.

Então, uma alça bacteriológica descartável de 10 µL foi utilizada para estriar um inóculo do enriquecimento secundário para a superfície de uma placa contendo Ágar Oxford Listeria (Neogen, Acumedia®), adicionado de seu suplemento antimicrobiano 7986 (Neogen, Acumedia®) (Tabela 1) e uma placa contendo Ágar Palcam (Neogen, Acumedia®) adicionado de seu suplemento 7987 (Neogen, Acumedia®) (Tabela 1) de modo a serem obtidas colônias isoladas. Em seguida, as placas foram incubadas invertidas a  $35 \pm 2$  °C por 24-48 horas.

**Tabela 1-** Composição dos suplementos de Caldo Fraser, Ágar Oxford e Ágar Palcam utilizados no cultivo bacteriano de *Listeria monocytogenes*.

SUPLEMENTO	COMPONENTES	QUANTIDADE (mg)*
<b>FRASER</b>	Acriflavina	25
	Ácido Nalidíxico	20
	Citrato Férrico Amoniacal	250
<b>OXFORD</b>	Acriflavina	5
	Cefotetan	2
	Sulfato de Coslitina	20
	Cicloheximida	400
	Fosfomicina	10
<b>PALCAM</b>	Polimixina B	5
	Acriflavina	2,5
	Ceftazidima	10

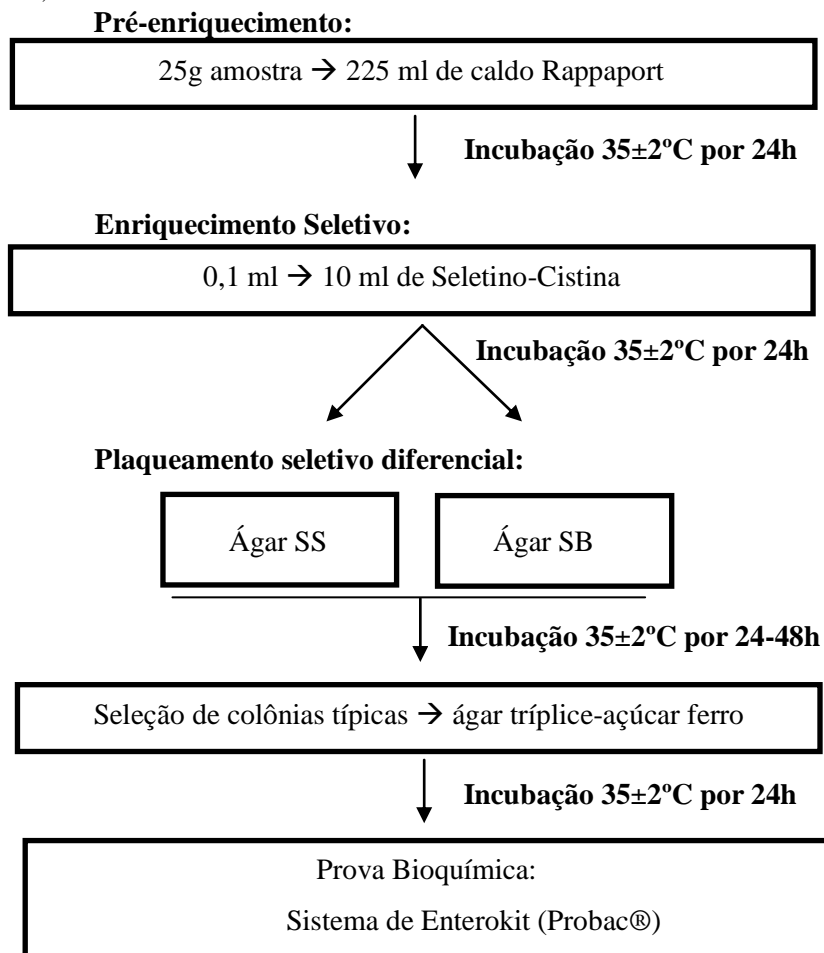
\*Fórmula por litro de água purificada – suplementado conforme necessário, para cumprir os critérios do desempenho.

Após o período de incubação, verificado o crescimento de colônias típicas, foi realizada a etapa de confirmação. Nesta fase, as amostras foram submetidas à prova bioquímica conforme descrita pelo método da Food and Drug Administration (FDA), que inclui: Coloração de Gram, motilidade a 25°C, teste de catalase, fermentação de carboidratos, hemólise e CAMP-test.

### 3.2.2 Pesquisa de *Salmonella* spp.

As análises microbiológicas para o isolamento e identificação de *Salmonella*, foram realizadas com base no Manual de Métodos de Análises Microbiológicas de Alimentos (SILVA, JUNQUEIRA, SILVEIRA, 2007), bem como metodologia descrita por Santos, 2006, a qual inclui uma etapa de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento seletivo e confirmação bioquímica (Figura 2).

**Figura 2-** Fluxograma das etapas para de identificação de *Salmonella* spp. pelo método microbiológico convencional, com base no Manual de Métodos de Análises Microbiológicas de Alimentos e metodologia descrita por Santos, 2006.



Inicialmente, no interior de uma cabine de segurança biológica pesou-se 25g da amostra obtida em pequenas frações de diversos pontos de cada unidade amostral (*pool* da amostra) adicionados, posteriormente, em garrafa de vidro contendo 225 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis (Neogen, Acumedia®) e incubado em estufa para cultura bacteriológica (Logen Scientific®) a uma temperatura de  $35 \pm 2$  °C por 24 horas.

O caldo Rappaport pré-incubado foi utilizado para o enriquecimento seletivo, inoculado com o auxílio de uma pipeta estéril 0,1 ml para um tubo de ensaio contendo 10 ml de Caldo Selenito Cistina (Splabor, Kasvi®) e incubado a  $35 \pm 2$  °C por 24 horas.

Ocorreu o plaqueamento pelo método de esgotamento com uma alça bacteriológica descartável de 10 µL, fazendo um inóculo em estrias do enriquecimento seletivo para a superfície de uma placa contendo Ágar Salmonella Shigella – SS (Neogen, Acumedia®) e uma placa contendo Ágar Bismuto Sulfito – BS (Neogen, Acumedia®). Em seguida, as placas foram incubadas invertidas a  $35 \pm 2$  °C por 24-48 horas.

Após a incubação, selecionou-se de cada placa colônias com características das de bactérias não fermentadoras da lactose e estas foram semeadas em tubos contendo ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI), os quais eram, a seguir, incubados a 35°C por 24 h. Posteriormente, as amostras foram submetidas à identificação bioquímica, realizada através do Sistema de Enterokit (Probac®).

O Enterokit B consiste dos seguintes meios: EPM (Produção de gás por fermentação da glicose; Produção de H<sub>2</sub>S; Hidrólise da ureia e Desaminação do triptofano), MILi (Motilidade; Produção de indol e Descarboxilação da lisina) e Citrato de Simmons (Citrato como única fonte de carbono). Os três meios totalizam oito testes que somados ao da fermentação da lactose na placa de isolamento, permitem identificar com fidelidade a grande maioria das enterobactérias isoladas de espécimes clínicos.

### 3.3 TABULAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS

Todas as informações foram tabuladas em planilha do Excel® e a interpretação dos achados ocorreu segundo descrição a seguir.

### 3.3.1 Padrões Microbiológicos

O Ministério da Saúde, através da Resolução nº 12 de 2001 (BRASIL, 2001), estabelece a quantidade máxima de microrganismos em alimentos, para que possam ser consumidos com segurança. No que tange a pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. é estabelecido a ausência desses microrganismos em uma alíquota de 25g de amostra. Logo, o resultado da determinação de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. foram expresso como Presença ou Ausência na amostra analisada.

### 3.3.2 Lista de Verificação

A lista de verificação, o documento de notificação da Vigilância Local (ANEXO A) é fundamento na Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2004), que dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação, bem como na Lei Complementar nº 052/2008 da Prefeitura Municipal de Macapá (PMM) que institui o Código Sanitário do município de Macapá, no que tange aos produtos sujeitos ao controle sanitário.

O documento é composto por 50 itens, que envolvem categorias relacionadas à edificação e instalações; equipamentos, móveis e utensílios; manipuladores; controle integrado a pragas; abastecimento de água; produção e transporte do alimento e documentação. A partir das inspeções nos estabelecimentos, e com base no documento supracitado, foram observados e descritos os itens da lista de verificação em menor conformidade, em que os achados foram expressos em prevalência de achados insatisfatórios.

### 3.3.3 Termo de Coleta de Amostra

Do termo de coleta das amostras (ANEXO B) foram extraídos, tabulados e analisados os dados referentes à temperatura (°C), o horário da coleta e o tipo de estabelecimento. Conforme RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004-ANVISA, considera adequadas temperaturas inferiores a 5°C, e 10°C como valor máximo permitido. Os achados foram expressos como em conformidade ou não segundo a legislação.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ISOLAMENTO MICROBIOLÓGICO

Foram analisadas 20 amostras de salmão (*Sashimi*) provenientes de 10 restaurantes especializados na culinária japonesa da cidade de Macapá, Amapá. As amostras foram submetidas a protocolos microbiológicos convencionais para a identificação das bactérias alvo do estudo, os resultados da pesquisa microbiológica encontram-se descritos na Tabela 2.

**Tabela 2-** Distribuição das conformidades e não conformidades das amostras de salmão (*Sashimi*), comercializadas em restaurantes especializados na culinária japonesa da cidade de Macapá, Amapá, quanto aos padrões microbiológicos analisados.

<b>Microrganismos pesquisados</b>	<b>Não conformidade n (%)</b>	<b>Conformidade n (%)</b>	<b>Padrões estabelecidos na legislação</b>
<i>Listeria monocytogenes</i>	0(0)	10(100)	Presença/Ausência em 25g*
<i>Salmonella</i> spp.	4(40)	6(60)	Presença/Ausência em 25g*

n: Número de restaurantes; %: Porcentagem; \*: Brasil, 2001.

Fonte: Dados da autora, 2019.

O Ministério da Saúde, através da Resolução nº 12 de 2001 (BRASIL, 2001), estabelece a quantidade máxima de microrganismos em alimentos, para que possam ser consumidos com segurança. No que tange a pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. é estabelecido a ausência desses microrganismos em uma alíquota de 25g de amostra. Segundo Gonçalves et al. (2014) listeriose e salmonelose são um desafio para a saúde pública, sendo a *Listeria monocytogenes* um patógeno de baixa incidência com alta taxa de mortalidade, enquanto *Salmonella* um patógeno de alta incidência com baixa taxa de mortalidade.

#### 4.1.1 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Das 20 amostras analisadas, seis (30%) foram consideradas suspeitas apresentando características típicas em ágar Oxford (colônias marrons a pretas) e em ágar Palcam (colônias verde acinzentado com precipitado preto) e destinadas às provas bioquímicas. Conforme descrição na bula dos reagentes (Neogen, Acumedia®), o ágar Oxford é utilizado com antimicrobianos para o isolamento seletivo de *Listeria* spp. Já o ágar Palcam é utilizado com suplementos como um meio seletivo e diferencial para a detecção e isolamento de *Listeria*

*monocytogenes* em alimentos e amostras ambientais. Todas as espécies de *Listeria* hidrolisam a esculina, ocasionando o escurecimento do meio. Tal escurecimento é resultado da formação de 6,7 di-hidroxicumarina, que reage com íons de ferro presentes nos meios (Oxford e Palcam) como Citrato Férrico Amoniacal.

Após a realização das provas bioquímicas, foi verificada ausência de *Listeria monocytogenes* em 100% das amostras analisadas (Tabela 2), o que indica que os resultados estão de acordo com a legislação brasileira vigente (BRASIL, 2001). Segundo Padilha et al. (2001) normalmente *L. monocytogenes* está presente nos alimentos em baixas concentrações, logo sua detecção torna-se difícil, independente da matriz alimentar, pois seu desenvolvimento pode ser sobrepujado pelos contaminantes, processos físicos e químicos envolvidos na produção.

Na literatura, são escassos os estudos que relatam a presença de patógenos em pescado cru do tipo salmão, principalmente no que diz respeito à pesquisa de *Listeria monocytogenes*. Quando se refere ao grupo pescado, estudo de Viana et al. (2016) corroboram com os resultados encontrados na presente investigação, onde realizou-se análise microbiológica de tambaqui (*Colossoma macropomum*) comercializado na feira municipal de Ariquemes, Rondônia. Na referida pesquisa, não foi detectada a presença de *Listeria monocytogenes*. Os achados descritos por Santos e Shigemura (2013), também se assemelham com os deste trabalho, em que pesquisaram a presença de *Listeria monocytogenes* em 10 amostras de pescado resfriado, não sendo possível o isolamento desta em nenhuma das amostras analisadas.

Ao contrário dos resultados encontrados neste estudo, Espíndola (2004) pesquisou a ocorrência de *Listeria* sp, em amostras de pescado e ambiente de indústria de processamento e comercialização de pescado do litoral de Santa Catarina. Das 74 amostras analisadas pelo método microbiológico convencional, por meio de isolamento e identificação bioquímica, foi encontrada ocorrência de 12% de *Listeria* sp. Sendo uma amostra (4%) isolou-se *Listeria innocua* e em duas (8%) *Listeria monocytogenes*. Já no estudo de Montanari et al. (2015) foram analisadas 15 amostras de *sashimi* de salmão *in natura* preparados e comercializados em três diferentes restaurantes japoneses do município de Ji-Paraná, Rondônia. Na pesquisa de *Listeria monocytogenes* verificou-se a presença em dois dos três restaurantes avaliados.

Em São Paulo, Cruz et al. (2008) realizaram um estudo com salmão *gravlax* com o objetivo de avaliar a incidência e disseminação de *L. monocytogenes* em 415 amostras obtidas de diferentes etapas de processamento de uma indústria. A presença de *L. monocytogenes* foi confirmada em amostras de salmão (41%), superfícies de contato (32%) e não contato (43%)

e manipuladores (34%), porém não se isolou o microrganismo em nenhum ingrediente. O estudo demonstrou altos valores de contaminação por *L. monocytogenes*, valores estes que divergem com os resultados obtidos no presente estudo.

No entanto, quando se considera outra matriz alimentar e a mesma bactéria alvo, Almeida (2014) em seu estudo encontrou resultados semelhantes ao deste trabalho, de 88 amostras de linguiça do tipo frescal de carne suína e carne de frango não houve isolamento de *Listeria monocytogenes*. Nero (2005) em um estudo de 210 amostras de leite cru, também não detectou a presença da bactéria. Em contrapartida, Andrade (2008) analisou 35 amostras de carne bovina, sendo que 04 foram consideradas positivas para *Listeria monocytogenes*. Já Byrne (2014) estudou um total de 99 amostras de vegetais, sendo 33 de vegetais frescos, 33 de vegetais congelados e 33 de vegetais prontos para o consumo (saladas prontas). Os resultados demonstraram que 4,04% das amostras apresentavam contaminação por *Listeria monocytogenes*.

Vale ressaltar que a ausência de *Listeria monocytogenes* nas amostras analisadas não significa que não haja risco biológico para a população que consome esse tipo de alimento, pois segundo Amagliani et al. (2012) as organizações de saúde mundiais devem estar sempre atentas aos surtos de origem biológica, física ou química decorrentes da contaminação direta ou cruzada, relacionadas principalmente a falhas na manipulação do alimento acarretando riscos à saúde do consumidor.

#### **4.1.2 Pesquisa de *Salmonella* spp.**

Para confirmação e isolamento de *Salmonella* spp., todas as amostras foram consideradas suspeitas, apresentando características típicas em ágar SS (colônias incolores com centros pretos) e ágar SB (colônias verde oliva a preto ± brilho metálico) e destinadas às provas bioquímicas, sendo detectado a presença de *Salmonella* spp. em amostras de quatro (40%) restaurantes (Tabela 2).

Conforme descrição na bula dos reagentes (Neogen, Acumedia®), ágar SS é um meio diferencial seletivo, empregado em bacteriologia para isolar *Salmonella* e *Shigella* a partir de fezes, urina e alimentos frescos ou enlatados. Enquanto o ágar BS é geralmente aceito para a detecção rotineira da maioria das espécies de *Salmonella*, além disso, é utilizado para o isolamento de *Salmonella typhi* e outras espécies de *Salmonella* provenientes de alimento, fezes, urina, esgoto e outros materiais infecciosos.



O resultado obtido no presente estudo é de grande relevância devido ao alto grau de patogenicidade da *Salmonella* spp., como já mencionado, a legislação brasileira determina que as salmonelas devem estar ausentes em qualquer produto alimentar para que o alimento seja considerado próprio para o consumo, pois bactérias desse gênero são nocivas à saúde humana, devido a produção de toxinas que podem causar infecções alimentares. Amagliani et al. (2012) ressaltam que bactérias do gênero *Salmonella* podem contaminar pescados durante o processamento, os quais podem, ainda, facilitar a contaminação cruzada com outros produtos durante os vários estágios de preparação.

O isolamento de *Salmonella* spp. nesta investigação é corroborado com aqueles encontrados por Braghini et al. (2015), que realizaram análise microbiológica quantitativa de 15 amostras de *sashimis* à base de salmão de cinco restaurantes diferentes da cidade de Maringá, Paraná, em que o resultado da presença de *Salmonella* spp. foi positivo em 20% das amostras. Já Santos (2006) em pesquisa com 20 amostras de “*sashimis*” comercializados em São Paulo constatou a presença de *Salmonella* spp. em 15% dos alimentos, considerados impróprios para o consumo. Já Malavota et al. (2009), num estudo sobre microrganismos patogênicos, pesquisaram a ocorrência de *Salmonella* em *sashimis* comercializados em restaurantes do município do Rio de Janeiro e encontram resultados positivos em 12,5% (oito) das 64 amostras analisadas.

Resultados similares foram encontrados também por Vieira et al. (2007) que ao analisarem o risco microbiológico do consumo de *sushi* e *sashimi* em 32 amostras preparadas em dois restaurantes da cidade de Fortaleza, Ceará, encontraram a presença de *Salmonella* em três (9,4%) e seis (18,8%) amostras de *sushi* e de *sashimi*, respectivamente. Bem como o estudo de Moura et al. (2015) que avaliaram a qualidade microbiológica de amostras (n=15) de *sushis* à base de salmão preparados em restaurantes (n=5) especializados em culinária japonesa da Região do Agreste Paraibano, onde das 15 amostras analisadas, em 2 (13,3%) foram confirmadas a presença de *Salmonella* spp.

No entanto, diferentemente dos resultados desta pesquisa, estudos de Martins (2006), Alcântara (2009), Vallandro et al. (2011) e Shinohara et al. (2018) não isolaram *Salmonella* spp. em nenhuma das amostras analisadas. Os trabalhos referem-se à análise de salmão (*sushi*, *sashimi*, *temaki*) preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa das cidades de São Paulo, Fortaleza, Porto Alegre e Recife, respectivamente.

Para Moura et al. (2015) a presença de *Salmonella* em estudos que envolvam amostras alimentares indicam a falta de um controle rígido de higiene dos manipuladores e o descaso com as Boas Práticas de Manipulação durante a preparação do alimento.

## 4.2 PARÂMETROS HIGIÊNICO-SANITÁRIOS

A categoria que apresentou itens em menor conformidade foram os parâmetros higiênico-sanitários associados aos manipuladores durante o preparo do alimento. A Tabela 3 descreve a prevalência de situações inadequadas nos restaurantes de acordo com os itens relacionados à categoria manipuladores.

**Tabela 3-** Itens da Lista de Verificação da Vigilância Sanitária Municipal associados à categoria manipuladores, que apresentaram menor conformidade nos restaurantes especializados na culinária japonesa da cidade de Macapá, Amapá.

<b>Itens da Lista de Verificação</b>	<b>Restaurantes n (%)</b>
<i>Pia exclusiva para a higiene das mãos na área de manipulação. Suprida de sabonete líquido antisséptico, toalhas de papel e lixeiras acionadas por pedal.</i>	10(100)
<i>Uso adequado e constante de EPI's (uniforme, sapato fechado, calça comprida e etc.)</i>	3(30)
<i>Uso de luva adequada e máscara descartável na manipulação de alimentos prontos.</i>	7(70)
<i>Boa apresentação pessoal, unhas curtas e sem esmalte, sem adorno (anel, pulseira, relógio, e outros).</i>	2(20)
<i>Risco de contaminação cruzada</i>	10(100)

n: Número de restaurantes; %: Porcentagem.

Fonte: Dados da autora, 2019.

Os manipuladores de alimentos, são definidos como todas as pessoas que entram em contato direto com o produto em qualquer etapa da cadeia alimentar, apresentam papel importante para a qualidade das preparações. A saúde e higiene desses profissionais são fundamentais para garantir um alimento seguro (SOARES, GERMANO, 2004; MARTINS, 2006).

Vallandro et al. (2011) ressaltam que o consumo de *sashimi* pode ser considerado de alto risco à saúde e ao desenvolvimento de problemas gastrointestinais, pois o mesmo é um alimento bastante manipulado e não passa por nenhum tipo de tratamento térmico capaz de diminuir ou eliminar possíveis agentes patogênicos ali presentes. Segundo Gonçalves et al. (2014) na maioria dos surtos de DTAs, a contaminação se dá pela manipulação inadequada e pelo armazenamento incorreto dos alimentos. Hábitos como a má higienização das mãos antes da manipulação dos alimentos, armazenamento sob temperaturas inadequadas e a aquisição de produtos de origem desconhecida e duvidosa são algumas das situações mais frequentes que colocam o alimento e a saúde do consumidor em risco.

Entre os itens que apresentaram menor conformidade destacam-se os aspectos da higienização das mãos e o risco de contaminação cruzada insatisfatório em todos os

restaurantes avaliados (100%) (Tabela 3). Tais resultados são corroborados com o encontrado no trabalho de Alcântara (2009) sobre qualidade higiênico-sanitária de *sushi* e *sashimi* servidos em restaurantes da cidade de Fortaleza, onde tais itens foram insatisfatórios também em todos os estabelecimentos analisados.

A RDC nº 216 (BRASIL, 2004) exige a presença de um lavatório exclusivo para higiene das mãos, em posição estratégica em relação ao fluxo do processo e de fácil acesso ao uso. Todos os restaurantes apresentavam uma única pia, sendo esta destinada a todos os processos de produção do alimento, desde a lavagem dos alimentos, utensílios e lavagem das mãos, potencializando o risco de contaminação cruzada. Para Soutos et al. (2006) a contaminação cruzada dos alimentos pode ocorrer através da superfície de contato, bem como contaminação secundária pelo piso, teto, paredes ou até mesmo equipamentos.

Em um estudo realizado por Queiroz et al. (2001) em 10 restaurantes tipo *self service* localizados na cidade de São Paulo, também constatou-se risco de contaminação cruzada em 13,64% dos restaurantes. Em 40% deles não havia controle de saúde adequado dos manipuladores. Moura filho e Mendes (2007) ressaltam que os vegetais utilizados para a apresentação do alimento possuem um grau de contaminação maior do que o filé de *sashimi* de salmão consumido, logo, a contaminação cruzada pode ocorrer também pelos vegetais quando mal higienizados.

Foi observado que apenas 3 (30%) restaurantes apresentavam um funcionário responsável pela supervisão da produção de alimento, devidamente certificado com curso de Boas Práticas na Manipulação de Alimentos. Segundo Silva, Junqueira e Silveira (2007), preparações muito manipuladas são classificadas no grupo dos alimentos de alto risco, especialmente quando preparadas por pessoas que não possuem treinamento adequado. Para Sousa (2006), a manipulação apropriada, seguindo os princípios de Boas Práticas de Fabricação é fundamental para assegurar o fornecimento de um alimento seguro ao consumidor. Os autores destacam ainda que o investimento em técnicas de manipulação adequadas e o treinamento de manipuladores de alimentos constituem estratégias preventivas importantes de DTAs.

Chama atenção a escassez de publicações avaliando parâmetros higiênico-sanitários de manipuladores de *sushi* e *sashimi*, considerando o risco presente, por se tratar de preparações que são servidas cruas. Oliveira et al. (2003) em pesquisa realizada com manipuladores de alimentos, concluíram que as condições higiênico-sanitárias do ambiente, qualidade da água, bem como a maneira de manipulação, influenciam diretamente na qualidade microbiológica

do alimento. Revelam ainda que a educação e o treinamento dos manipuladores seriam as melhores ferramentas para assegurar a qualidade da alimentação.

Em relação aos utensílios, 4 (40%) dos restaurantes foram considerados inadequados por apresentarem utensílios impróprios ao uso em alimentos, não estando rigorosamente limpos e bem conservados. A RDC nº 216, bem como Lei Complementar nº 052/2008 da Prefeitura Municipal de Macapá não permite o uso de equipamentos e utensílios constituídos de material poroso, madeira, vidro, material esmaltado, susceptível à oxidação, nas etapas de fracionamento, pré-preparo e preparo final dos alimentos.

Outra categoria que chamou atenção na aplicação da lista de verificação foi a relacionada à documentação, em que 2 (20%) restaurantes foram notificados quanto aos itens “*Realizar a abertura do processo de licenciamento sanitário junto a este departamento*”, bem como, “*Reunir ao processo as carteiras de saúde de todos os funcionários, independentemente do vínculo*”. Já o item “*Disponer de programas de controle de pragas*”, foi verificado que 3 (30%) restaurantes não apresentaram certificado de serviço de desinsetização e desratização do estabelecimento realizado por empresa prestadora.

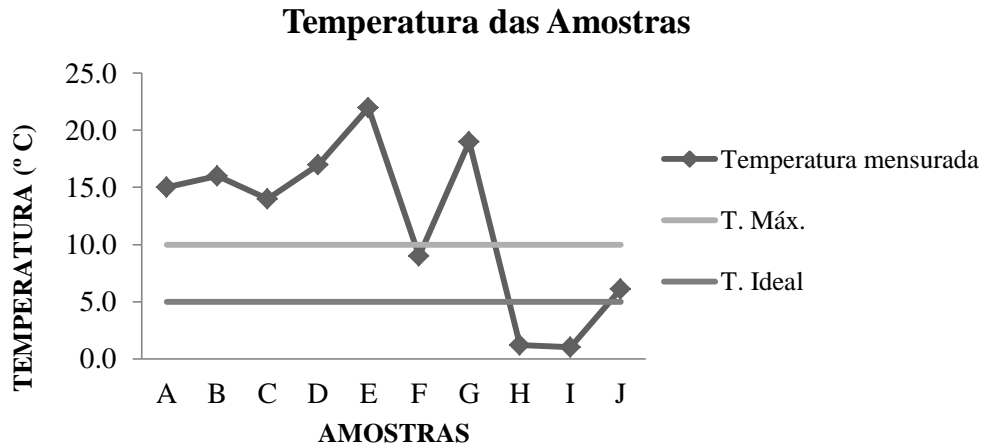
Apesar de ainda ser incipiente no Brasil a discussão dos aspectos ligados a condições higiênico-sanitária e nutricional de *sushi* e *sashimi*, vários países estão discutindo a temática e elaborando normas e leis específicas para assegurar a qualidade microbiológica destas preparações. No Brasil, Mello, Back e Colares (2008) destacaram a necessidade de criação de um roteiro específico para fiscalização de restaurantes que comercializam pratos da culinária japonesa, sejam especializados ou não. Declaram ainda que os itens que compõem o *checklist* para fiscalização devem ser amplamente discutidos, no âmbito da vigilância sanitária, a fim de se proceder a normatização de procedimentos que facilitem a fiscalização e garantam a chegada de um produto seguro para o consumidor.

#### 4.3 TEMPERATURA DAS AMOSTRAS

Os valores referentes à temperatura das amostras analisadas variaram de 1.0 a 22 °C ( $12 \pm 7.3$ ), sendo que apenas 2 amostras (H e I) apresentaram-se em conformidade com os parâmetros preconizados pela legislação RDC nº 216 de 15 de setembro de 2004 da ANVISA, que dispõe sobre regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação. O recomendado por esse regulamento é que os produtos desse gênero sejam comercializados em temperaturas  $\leq 5^\circ\text{C}$ , ou seja, no mínimo refrigerado (BRASIL, 2004). É importante relatar que outras 2 amostras (F e J), apesar de estarem em desacordo com a legislação, apresentaram

temperaturas com valores inferiores a 10°C, sendo estabelecida como a temperatura máxima aceitável para exposição e armazenamento (Figura 3).

**Figura 3** Comparação entre a temperatura mensurada, temperatura ideal recomendada e temperatura máxima aceitável conforme RDC nº 216 de 15 de setembro de 2004 da ANVISA.



Fonte: Dados da autora, 2019.

Os estudos demonstram que o controle de temperatura de comercialização dos produtos de pescado pronto pra consumo tem sido um grande desafio. Vallandro et al. (2011) observaram em sua pesquisa que dos restaurantes especializados em culinária japonesa na cidade de Porto Alegre, todos mantinham o pescado em temperaturas de armazenamento insatisfatórias ( $\leq 5$  °C). Assim como relatado no estudo de Soares e Germano (2004), que os valores da temperatura obtidos variaram entre 9,1°C e 22,8°C. Abreu et al. (2015) avaliaram o frescor de *sashimis* de salmão comercializados em Cuiabá-MT e relataram que 100% das amostras avaliadas estavam sendo comercializadas em temperaturas de 8,2°C a 23,3°C, sendo essas acima do que é exigido pela legislação brasileira.

Alcântara (2009) também descreveu alto grau de inconformidades quanto à temperatura, em um estudo que avaliou a qualidade higiênico-sanitária de *sushi* e *sashimi* servidos em restaurantes da cidade de Fortaleza e registrou temperatura inadequada para 100% das amostras de *sushi* cru e 90,9% de *sashimi*.

A temperatura tem uma grande influência no crescimento de microrganismos. O processo de crescimento depende de reações químicas que são alteradas pela temperatura. De acordo com Martins (2006) as temperaturas baixas podem diminuir o metabolismo bacteriano, inibindo a multiplicação destes e contribuindo para a conservação dos alimentos. No entanto, vale ressaltar que a refrigeração não pode ser considerada como um processo bactericida,

tendo em vista que muitos patógenos se multiplicam na temperatura de refrigeração, como é o caso das bactérias alvo deste estudo (*Listeria monocytogenes* a 4°C e *Salmonella* spp. a 6°C).

Para Forsythe (2013) e Shinohara et al. (2018) o salmão destinado ao preparo de pratos da culinária japonesa como o *sashimi* deve ser fresco, e não submetido ao congelamento, para não perder a textura característica, devendo ser apenas resfriado com o propósito de controlar o desenvolvimento microbiológico. Logo, sua captura, manipulação e conservação necessitam de atenção especial.

Aliado a isso, Vallandro et al. (2011) ressaltam a importância dos cuidados com a cadeia fria de conservação de produtos perecíveis para manter as populações bacterianas abaixo das doses infectantes para o consumidor. Nos casos dos alimentos consumidos crus, como aqueles que compõem a culinária japonesa, esses aspectos são ainda mais relevantes e devem ser controlados pela adoção de Boas Práticas de manipulação e constante monitoramento pelas autoridades sanitárias.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados de *Listeria monocytogenes* encontrados nesta pesquisa foram satisfatórios, pois se constatou ausência da mesma em todas as amostras analisadas, porém deve ser reforçada a necessidade de um amparo legal, para facilitar reconhecimento das pesquisas, ações de controle mais amplas e divulgação da gravidade da doença, principalmente em mulheres grávidas, crianças, idosos e adultos com o sistema imunológico debilitado que constituem a população mais vulnerável.

A ocorrência do gênero *Salmonella* spp. em algumas amostras pode ser resultado de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, sendo necessário a adoção de medidas de controle de qualidade para evitar doenças e transtornos de origem alimentar. O constante monitoramento das Boas Práticas de manipulação é ferramenta imprescindível para a segurança e sustentabilidade de um alimento que vem tendo um consumo crescente pela população.

As amostras analisadas representam risco à saúde do consumidor, comprometendo sua segurança alimentar e nutricional, considerando a associação de parâmetros higiênico-sanitários insatisfatórios de manipuladores, temperatura inadequada e isolamento de *Salmonella* spp. Portanto, torna-se essencial a necessidade de continuação e ampliação de estudos como este, os quais visam o monitoramento da ocorrência de patógenos em alimentos, sobretudo dos consumidos *in natura*; além de ampla discussão para a elaboração de normas adequadas para preparo e comercialização desse tipo de alimento, visto que este é um tema de grande relevância à saúde pública.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, M. C. C. et al. **Avaliação do frescor de sashimis de salmão comercializados em Cuiabá-MT**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Mato Grosso, Programa de Pós-graduação em Ciências Animal, 2015.
- ABULREESHIN, H. H. Salmonellae in the environment, in *Salmonella* - distribution, adaptation, control measures and molecular technologies. **Annous & Gurtler, InTech**, p. 19-50, 2012.
- ALCÂNTARA, B. M. **Qualidade higiênico-sanitária de Sushi e Sashimi servidos em restaurantes da Cidade de Fortaleza: Modismo alimentar e risco à saúde**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Fortaleza, Ceará, 2009.
- ALMEIDA, T. L. de. **Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em liguiças do tipo frescal**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás. Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos. Goiânia, 2014.
- AMAGLIANI, G. et al. Microbiological Surveillance of a Bovine Raw Milk Farm Through Multiplex Real- Time PCR. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 9, n. 5, p. 406-411, 2012.
- AMSON, M. L; HARACEMIV, S. M. C; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos a ocorrências / surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Revista de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal de Lavras**, v. 30, n. 6, p. 1139–1145, 2006.
- ANDRADE, R. R. **Identificação microbiológica e diferenciação de espécies de *Listeria* spp. por análise de restrição de fragmentos de PCR (RFLP-PCR) em amostras de carnes e derivados comercializados no Distrito Federal**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.
- ANDREWS W. Current State of Conventional Microbiological Methodology for the Examination of Food. *In: Workshop 102–15. Microorganisms in Foods: Now What? American Society for Microbiology*, Washington, DC, USA, 2002.
- BORGHESI, R. et al. **Influência da nutrição sobre a qualidade do pescado: Especial referência aos Ácidos Graxos**. Embrapa Pantanal. Corumbá, MS, 2013.



BRAGHINI, F. et al. Análise microbiológica de *sashimis* a base de salmão, comercializados na cidade de Maringá-PR. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer** - Goiânia, v. 11, n. 22; p. 2015.

BRASIL, 2001. Ministério da Saúde. Resolução – RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc\\_12\\_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b)>. Acessado em 19 set. 2018.

\_\_\_\_\_, 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RCD nº 216, de 15 de setembro de 2004: Legislação de boas práticas para serviços de alimentação**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/bps.htm>>. Acessado em: 20 set. 2018.

\_\_\_\_\_, 2005. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº24, de 16 de Dezembro de 2005**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/sem-entes-e-mudas/publicacoes-sementes-e-mudas/INN24de16dedezembrode2005.pdf>>. Acessado em: 21 maio 2018.

\_\_\_\_\_, 2018. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde- SVS. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. Disponível em: <<http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>>. Acesso em: 01 abril 2018.

BYRNE, V de V. ***Listeria monocytogenes* em vegetais frescos, congelados e prontos para o consumo e resistência a antimicrobianos**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. Salvador, 2014.

CRUZ, C. et al. Comparing rapid methods for detecting *Listeria* in seafood and environmental samples using the most probably number (MPN) technique. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 483–487, 2012.

CRUZ, C. D. et al. Epidemiologia de *Listeria monocytogenes* em uma linha de processamento de salmão *gravlax*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p.375-383, 2008.

DICKEL et al. Análise comparativa entre microbiologia convencional, ELISA e PCR para detecção de *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum* e *S. pullorum* em carne de frango contaminada artificialmente. **Revista Brasileira de Ciências Veterinária**. v. 12, n. 13, p. 5-10, 2005.

ESPÍNDOLA, J.C. **Ocorrência de *Listeria sp*, em amostras de pescado e ambiente de indústria de processamento e comercialização de pescado do litoral de Santa Catarina.** Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia Ambiental) – Universidade do Vale do Itajaí, Centro de Educação de Ciências Tecnológicas, da Terra e do Mar, Santa Catarina, 2004.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2018). **The state of world fisheries and aquaculture: Meeting the sustainable development goals.** Roma: FAO. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/i9540en/I9540EN.pdf>>. Acesso em 14 out. 2018.

FERREIRA, E. M. et al. Qualidade microbiológica do peixe serra (*Scomberomerus brasiliensis*) e do gelo utilizado na sua conservação. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 81, n. 1, p. 49-54, 2014.

FORSHELL, L. P; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal foods products. **Revue Scientifique Technique Office International des Epizooties**, Paris, v.25, n.2, p. 541-554, 2006.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos.** 2 ed. p. 104 – 107; 144-145 Porto Alegre: Artmed, 2013.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2004.

FREITAS, E. I; LEMOS, A. A; MARIN, V. A. Validation of qualitative alternative methods in the detection of food-born pathogens. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 11, n. 4, p. 1073-1083, 2006.

FRETZ, R. et al. Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese **Quargel, Austria and Germany.** Euro Surveillance, v. 15, 2009.

GARCIA, D. P; DUARTE, D. A. Perfil epidemiológico de surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos no Brasil. **Revista eletrônica acervo saúde**, v. 6, n. 1, p. 545-554, 2014.

GARRIDO V. et al. Temperature distribution in Spanish domestic refrigerators and its effect on *Listeria monocytogenes* growth in sliced ready-to-eat ham. **Food Control**, v. 21, p. 896-901, 2010.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Agentes bacterianos de toxinfecções alimentares. In: **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 4. ed. Barueri, São Paulo: Manole, 2011. 1088 p.

GONÇALVES, J. S. et al. Detecção de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* através de técnica de pcr. **Arquivo de Ciências Veterinária e Zootecnia**, UNIPAR, Umuarama, v. 17, n. 4, p. 223-226, 2014.

JAY, James M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p. ISBN 853630507X.

JEYALETCHUMI, P. et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. **International Food Research Journal**, v. 17. p. 1-11, 2010.

KUMAR H. S. et al. Detection of *Salmonella* spp. in tropical seafood by polymerase chain reaction. **International Journal Food Microbiology**, v. 88, p.91-95, 2003.

MARINS, B. R. et al. **Segurança alimentar no contexto da vigilância sanitária: reflexões e práticas**. Fundação Oswaldo Cruz. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio. Rio de Janeiro: EPSJV, 2014.

MALAVOTA, L. C. M. et al. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella* spp em “sashimis” comercializados em restaurantes no município do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 16, n. 2, p. 89-94, maio/ago. 2009.

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

MELLO, A.; BACK, F.; COLARES, L. Proposta de um roteiro de inspeção sanitária para avaliação de restaurante de culinária japonesa. In: Congresso Brasileiro de Nutrição – CONBRAN, 2008, [S. l.]. Anais... [S. l.], 2008. **Revista da Associação Brasileira de Nutrição**, tema 939, p. 249, 2008.

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. **Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 2, n. 1, p. 4-16, 2015.

MOURA FILHO, L. G. M. M.; MENDES, E. S. **Enumeração e pesquisa de *vibrio* spp. e coliformes totais e termotolerantes em sashimis de atum e vegetais comercializados na região metropolitana do Recife, Estado de Pernambuco.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2007.

MOURA, R. F. et al. Avaliação microbiológica de *sushis* a base de salmão preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa da Região do Agreste Paraibano. **Alimentação Humana**, v. 21, n. 1, 2 e 3, 2015.

NEIVA, C. R. P. Cresce interesse pelos aspectos nutricionais do pescado. **Unidade Laboratorial de Referência em Tecnologia do Pescado**, Instituto de Pesca, p. 7, 2010.

NERO, L. A. ***Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção.** Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

OLIVEIRA, A. B. A. et al. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, v. 30, n. 3, 2011

OLIVEIRA, A. M. et al. Manipuladores de alimentos: um fator de risco. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17 n.114/115, p.12-19, nov /dez 2003.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (2018). **Informações técnicas – Doenças Transmitidas por Alimentos.** Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos/informacoes-tecnicas>>. Acesso em: 21 out. 2018.

PALMA, J. M. **Caracterização molecular de cepas de *Listeria monocytogenes* oriundas de corte bovino e abatedouros frigoríficos de bovinos localizado no Distrito Federal.** Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília. Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal. Brasília, 2016.

PADILHA, M. R. F. et al. Investigation of pathogenic bacteria in pasteurized type C milk sold in Recife City, Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 34, n. 2, Mar-Abril, 2001.

PARIHAR, V. S. et al. Characterization of human invasive isolates of *Listeria monocytogenes* in Sweden 1986-2007, **Journal of Foodborne Pathogens and Disease**, New York, v. 5, n. 6, p. 755-761, 2008.

PIENIAK, Z. et al. Related attitudes as a basis for segmenting European fish consumers. **Food Policy**, v.35, p.448-455, 2010.

QUEIROZ, A. A. A. et al. Boas práticas de fabricação em restaurantes “*self-service* a quilo” - aspectos gerais – São Paulo, 1999. **Revista Net Technologies – DTA**, v.1, n.1, p.1-10, 2001.

ROHDE, A. et al. Fishing for bacteria in food – A promising tool for the reliable detection of pathogenic bacteria. **Food Microbiology**, v. 46, p. 395–407, 2015.

SANTIAGO, J. A S. et al. Bactérias patogênicas relacionadas à ingestão de pescado – revisão. **Arquivo de Ciências do Mar**, Fortaleza, v. 46, n. 2, p. 92-103, 2013.

SANTOS, R. M. **Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de peixes comercializados em Mercados Municipais da cidade de São Paulo, SP**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. São Paulo, 2006.

SANTOS, V. B.; SHIGEMURA, J. L. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em amostras de pescado resfriado destinados ao consumo humano, colhidas nas feiras livres de São Bernardo do Campo, SP. In: **13º Congresso Nacional de Iniciação Científica**, São Paulo, 2013.

SHINOHARA, N. K. S. et al. Salmon temaki: microbiological and percentage analysis of organic residues. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v. 03, n. 01, p. 118-125, 2018.

SOARES, C. M.; GERMANO, P.M.L. Análise da qualidade microbiológica de *sashimis*, comercializados em shopping centers da cidade de São Paulo, Brasil. **Higiene alimentar**, n. 116/117, p. 88-92, 2004.

SOUSA, C. P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista de Atenção Primária em Saúde**, v. 9, n. 1, 2006.

SILVA JÚNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 6. ed. São Paulo: Varela, 2002.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. A. C.; SILVEIRA, F. A. Métodos de análises microbiológicas de alimentos. **Manual técnico ITAL**, Campinas, n. 14, p. 135-141, 2007.

TONIAL, I. B. et al. Caracterização físico-química e perfil lipídico do salmão (*Salmo salar* L.). **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 21, n.1 p, 93-98, 2010.

VALLANDRO, M. J. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de *sashimis* à base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 2, p. 144-50, 2011.

VIANA, I. C. L. A. et al. Análise microbiológica do tambaqui (*Colossoma macropomum*) comercializado na feira municipal de Ariquemes, Estado de Rondônia, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde.**, v. 7, n. 2, p. 67-73, 2016.

VIEIRA, R. H. S. F. et al. *Salmonella* e *Staphylococcus coagulase* positiva em *sushi* e *sashimi* preparados em dois restaurantes da cidade de Fortaleza, Ceará. **Boletim Técnico Científico do CEPENE**, v. 14. p. 1-10, 2007.

VILA NOVA, C. M. V. M.; GODOY, H. T.; ALDRIGUE, M. L. Composição química, teor de colesterol e caracterização dos lipídios totais de tilápia e pargo (*Oreochromis niloticus*) (*Lutjanus purpureus*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 3, p. 430-436, 2005.

WELKER, C. A. D. et al. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociência**, v. 8, n. 1, p. 44-48, 2010.

## ANEXO A – LISTA DE VERIFICAÇÃO

	<b>PREFEITURA MUNICIPAL DE MACAPÁ</b> <b>SECRETÁRIA MUNICIPAL DE SAÚDE</b> <b>COORDENAÇÃO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE</b> <b>DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA</b>	<b>NOTIFICAÇÃO</b> <b>Nº _____</b>

PROCESSO Nº \_\_\_\_\_

Razão Social ou Nome do proprietário		Nome Fantasia ou Apelido do Proprietário	
CNPJ ou CPF	Inscrição estadual ou Identidade	Atividade econômica	
Endereço do Estabelecimento		Nº	Bairro
			Telefone

No dia \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_, às \_\_\_\_\_ horas, no exercício da fiscalização sanitária, realizei(amos) esta notificação. O estabelecimento deverá cumprir as exigências sanitárias abaixo assinaladas, no prazo de \_\_\_\_\_ dias. O não cumprimento das determinações implicará em medidas administrativas. Lista de verificação fundamentada na RDC nº 216/2004-ANVISA e na lei complementar nº 052/2008-PMM:

( ) Realizar a abertura do processo de licenciamento sanitário junto a este departamento;

( ) Reunir ao processo as carteiras de saúde de todos os funcionários, independentemente do vínculo;

( ) Reunir ao processo de permissão de uso do passeio/logradouro público emitida por Órgão municipal;

( ) O acesso às instalações não pode ter comunicação direta com as dependências de uma residência;

( ) As diferentes atividades da produção devem estar em áreas bem definidas;

( ) O fluxo da produção deve ser de um só sentido, sem cruzamentos de atividades;

( ) As aberturas externas (cobogó, exaustor, portas, janelas) devem estar providas com telas milimétricas;

( ) As conexões com a rede de esgoto/fossa séptica devem estar sem vazamentos, refluxos, etc;

( ) Os ralos devem ser sifonados e com grelhas que permitam seu fechamento manual;

( ) As caixas de gordura e de esgoto devem estar localizadas fora da área de preparação e armazenamento;

( ) As áreas internas e externas devem estar livres de materiais em desuso ou estranhos à produção;

( ) As instalações devem estar sempre limpas e organizadas sem acúmulos de alimentos e/ou sujidades;

( ) As instalações devem ter paredes, piso e teto revestidos de material liso, impermeável e lavável (pintura adequada ou em cerâmica) e mantidos sem rachadura, buracos, infiltrações e bolores;

( ) As instalações elétricas aparentes devem estar protegidas, e as luminárias com proteção e limpas;

( ) Dispor de um sistema de exaustão adequado, que garanta conforto térmico;

( ) As instalações Sanitárias devem estar sempre limpas, organizadas e conservadas;

( ) As instalações Sanitárias devem estar dotadas de pia, vaso sanitário com descarga e assento, lixeira com tampa acionada por pedal, papel higiênico, sabonete líquido antisséptico e toalhas de papel;

( ) As instalações Sanitárias não devem se comunicar com a área de produção e armazenamento;

( ) Dispor de pia exclusiva para a higiene das mãos na área de manipulação. Suprida de sabonete líquido antisséptico, toalhas de papel e lixeira com acionada por pedal;

( ) Os utensílios devem estar rigorosamente limpos e bem conservados;

( ) Os utensílios (talheres, tábuas de corte, pincéis e outros) devem ser adequados ao uso em alimentos de material liso, impermeável, e lavável ( não utilizar madeira);

( ) Os utensílios (panelas, fôrmas, partos, copos, talheres, descartáveis) devem estar devidamente guardados em local protegido (armários ou em prateleiras ou dentro de caixas plásticas com tampa);

( ) Os equipamentos e os móveis devem ser mantidos em adequadas condições de higiene/limpeza;

( ) Os equipamentos devem estar livres de descascamentos, áreas enferrujadas e outras imperfeições;

( ) Os móveis e superfícies (mesas, bancadas) que entram em contato com os alimentos devem ser de material liso, impermeável e lavável, livre de frestas e outras imperfeições((não usar madeira )

( ) Dispor de produtos de limpeza regularizados, identificados e guardados em local apropriado/exclusivo;

( ) Dispor de utensílios de limpeza adequados, bem conservados e guardados em local apropriado/exclusivo;

( ) Dispor de coletores de lixo com tampa acionados por pedal, bem conservados e limpos;

- ( ) Não deve haver a presença de insetos, roedores e outros animais, ou seus vestígios no estabelecimento;
- ( ) Dispor de programas de controle de pragas. O serviço deve ser executado por empresa especializada;
- ( ) As roupas e objetos pessoais devem ser guardados em local reservado e fora da área de produção;
- ( ) Uso adequado e constante de EPI's (sapato fechado, calça comprida, camisa com mangas, touca ou rede e avental) em cores claras, mantidos limpos. Utilizar luva adequada à atividade;
- ( ) É recomendado o uso de luva adequada e máscara descartável na manipulação de alimentos prontos;
- ( ) Boa apresentação pessoal, unhas curtas e sem esmalte, sem adorno (anel, pulseira, relógio, e outros);
- ( ) A área de armazenamento deve estar limpa e organizada, os alimentos, as embalagens descartáveis, os produtos de limpeza, dentre outros, devem estar armazenados separadamente uns dos outros;
- ( ) Os alimentos, as louças e os descartáveis mesmos embalados não podem ficar em contato direto com o piso, devem ser acondicionados sobre estradas e/ou prateleiras feitos de material liso, impermeável e lavável;
- ( ) Os alimentos não devem ser mantidos em embalagens abertas, devendo ser armazenados e, recipientes tampados e identificados (nome, data de fracionamento e prazo de consumo após aberturas da embalagem);
- ( ) Os alimentos sob refrigeração ou congelamento devem ser acondicionados em recipientes fechados com tampa ou papel filme, separados por grupos e identificados (data de preparo e prazo de validade);
- ( ) Manipular ou armazenar alimentos crus, em separado de alimentos semi-prontos ou prontos;
- ( ) Utilizar somente água potável. No caso de fonte alternativa (poço) a água deve ser clorada;
- ( ) Dispor de filtro para a filtragem da água;
- ( ) Os alimentos a serem consumidos crus (verduras, legumes, frutas) devem ser higienizados em solução clorada (água sanitária apropriada ou a solução de hipoclorito) conforme instruções de uso do fabricante;
- ( ) Não comercializar ou utilizar alimentos sem precedência (nome, data de fabricação e validade)
- ( ) A utilização dos produtos alimentícios deve respeitar o prazo de validade dos mesmos;
- ( ) Os óleos/gorduras devem ser substituídos quando apresentarem alteração de cor, espuma e fumaça;
- ( ) Dispor de equipamentos (balcão térmico e/ou refrigeração ou similares) adequados para exposição dos alimentos preparados na área de venda/refeitório. A quente acima de 60°C, e a frio inferior a 10°C;
- ( ) O equipamento de exposição do alimento preparado da área do refeitório deve dispor de coberturas de proteção adequadas, para evitar a presença de insetos, proximidade e contaminação por consumidores;
- ( ) Dispor de equipamento térmico adequado e limpo para transporte de alimento preparado;
- ( ) Os meios de transporte dos alimentos preparados devem ser limpos, cobertos e de uso exclusivo;
- ( ) O responsável pela supervisão da produção de alimentos deve ser o proprietário ou funcionário designado, sendo submetido a Curso de Boas Práticas na Manipulação de Alimentos.

Nome da Autoridade Sanitária	Identidade	Cargo/Função	Assinatura

Nome do Proprietário ou Responsável	Identidade	Local, Data e Horário	Assinatura

**Por motivo de recusa ou ausência do proprietário ou responsável, assina(m) a(s) testemunha(s):**

Nome da Testemunha	Identidade	Assinatura





## ANEXO C – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO


Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia



**Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em Sashimi à base de Salmão, Comercializado em Restaurantes Especializados na Culinária Japonesa da Cidade de Macapá, Amapá, Brasil.**

Journal:	<i>Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Keyword:	Microbiologia, Salmão, Segurança alimentar, Saúde pública

## Confirmação da submissão

 imprimir

Obrigado pela sua submissão

### Submetido para

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

### ID do manuscrito

ABMVZ-2019-11532

### Título

Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em Sashimi à base de Salmão, Comercializado em Restaurantes Especializados na Culinária Japonesa da Cidade de Macapá, Amapá, Brasil.

### Autores

Aires, Monizi  
Sá-Oliveira, Júlio César  
Muller, Elza Caroline  
Nascimento, Rafael  
Silva, Otávio  
Trindade, Diogo Vitor

### Data da submissão

21-mai-2019