



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/ UNB**  
**CURSO DE FARMÁCIA**

**FLÁVIA BIANCA AMARAL ALVES**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE SUSHIS**  
**COMERCIALIZADOS NO DISTRITO FEDERAL**

**BRASÍLIA, DF**

**2019**

FLÁVIA BIANCA AMARAL ALVES

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE SUSHIS  
COMERCIALIZADOS NO DISTRITO FEDERAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

**Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi**

**Co-orientador: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva**

BRASÍLIA, DF

2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Aa           Amaral Alves, Flávia Bianca  
              AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE SUSHIS  
              COMERCIALIZADOS NO DISTRITO FEDERAL / Flávia Bianca Amaral  
              Alves; orientador Daniela Castilho Orsi; co-orientador  
              Izabel Cristina Rodrigues da Silva. -- Brasília, 2019.  
              46 p.

              Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de  
              Brasília, 2019.

              1. Sushi. 2. Microbiologia de alimentos. 3.  
              Staphylococcus aureus. 4. Vinagre. 5. Concentração inibitória  
              mínima. I. Castilho Orsi, Daniela, orient. II. Rodrigues da  
              Silva, Izabel Cristina, co-orient. III. Título.

FLÁVIA BIANCA AMARAL ALVES

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE SUSHIS  
COMERCIALIZADOS NO DISTRITO FEDERAL**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Mestranda Lorena Cristina Messias Fernandes  
(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2019

## **AGRADECIMENTOS**

Chegar até aqui não é consequência de um esforço individual, ele resulta de consideráveis contribuições recebidas durante essa caminhada. Então, agradeço primeiramente, à Universidade de Brasília, seu corpo docente, direção, administração e funcionários por concretizar uma das etapas mais importantes e sonhadas por mim.

Ao meu companheiro de vida e melhor amigo, Mateus, que esteve ao meu lado desde o início da graduação. Me auxiliou, instruiu e me deu suporte sempre com muita paciência e compreensão. Serei eternamente grata.

A minha querida mãe, Marilda, que com amor e em meio a muitas dificuldades, fez o possível para me proporcionar uma educação de qualidade.

À toda minha família, principalmente minha irmã Paula e meu padrasto Paulino, que me encheram de cuidado, carinho e incentivo, acreditando e torcendo por mim.

A minha orientadora, Daniela, que há quase 2 anos acreditou no meu potencial, e com sua paciência, cuidado e exemplo contribuiu grandemente para a profissional que estou me tornando.

A minha coorientadora, Izabel, que não mediu esforços para me ajudar com a iniciação científica e que sempre demonstra preocupação e solicitude com seus alunos.

A todos os amigos da graduação, que estiveram ao meu lado nas várias disciplinas e estágios, compartilhando conhecimentos, experiências, decepções e, principalmente, histórias que ficarão para sempre em minha memória.

## RESUMO

Neste estudo, foi avaliada a qualidade microbiológica de sushis comercializados em estabelecimentos especializados e não especializados em culinária oriental do Distrito Federal. Para as análises microbiológicas foram coletadas 12 amostras de sushis, sendo sete provenientes de restaurantes especializados em comida oriental e cinco de embalagens dispostas em balcões refrigerados de supermercados e padarias. As análises realizadas foram: contagem total de bactérias mesófilas e psicrófilas, determinação de coliformes totais e coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus*, pesquisa de *Escherichia coli* e de *Salmonella* spp., além de identificação molecular de *E. coli* e *S. aureus* através da técnica de PCR. Foi realizado ainda um estudo da atividade antimicrobiana do vinagre de arroz (ingrediente usado na elaboração do sushi) através do método de macrodiluição em caldo para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) desse composto. Os resultados mostraram que as amostras de sushis coletadas em restaurantes especializados em culinária oriental estavam mais contaminadas com coliformes termotolerantes e bactérias *S. aureus* do que as amostras coletadas em embalagens dos supermercados e padarias. Dentre as 12 amostras de sushi analisadas, 6 amostras (50%) apresentaram bactérias *S. aureus*, sendo que 2 amostras (16,7%) excederam o limite aceitável estabelecido pela legislação brasileira (máximo de  $3,69 \log \text{ UFCg}^{-1}$ ) e, portanto, estavam impróprias para o consumo. As outras 10 amostras (83,4%) estavam em condições microbiológicas aceitáveis para o consumo de acordo com a legislação brasileira, indicando uma boa procedência da matéria prima usada na produção dos sushis e técnicas corretas de preparo desse alimento. O vinagre de arroz testado apresentou efeito bactericida (CBM) e bacteriostático (CIM) tanto para as bactérias gram positivas (*S. aureus* e *B. cereus*) quanto para as bactérias gram negativas (*Salmonella* e *E. coli*) testadas neste estudo, o que pode ter contribuído para os resultados favoráveis observados nas amostras de sushi.

**Palavras-chave:** sushi, microbiologia de alimentos, *Staphylococcus aureus*, vinagre, concentração inibitória mínima

## ABSTRACT

In this study, the microbiological quality of sushis marketed in specialized and non-specialized establishments in oriental cuisine of the Federal District was evaluated. For the microbiological analysis, 12 samples of sushis were collected, seven of them coming from restaurants specialized in oriental foods and five from packages placed in refrigerated counters of supermarkets and bakeries. The analyzes realized were total counting of mesophilic and psychrotrophic bacteria, determination of total coliforms and thermotolerant coliforms, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* count, as well as molecular identification of *E. coli* and *S. aureus* through PCR technique. A study of the antimicrobial activity of rice vinegar (ingredient used in the elaboration of *sushi*) was carried out using the broth macrodilution method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of this compound. The results showed that samples of *sushis* collected in restaurants specialized in oriental cuisine were more contaminated with thermotolerant coliforms and *S. aureus* bacteria than samples collected in supermarket and bakery packages. Among the 12 sushi samples analyzed, 6 samples (50%) had *S. aureus* bacteria, and 2 of them (16.7%) exceeded the acceptable limit established by Brazilian legislation (maximum of 3.69 log UFCg<sup>-1</sup>) and, therefore, were improper for consumption. The other 10 samples (83.4%) were in acceptable microbiological conditions for consumption according to the Brazilian legislation, indicating a good origin of the raw materials used in the preparation of the *sushis* and the use of suitable techniques to prepare that food. The rice vinegar tested showed bactericidal (MBC) and bacteriostatic (MIC) effect for both the gram positive bacteria (*S. aureus* and *B. cereus*) and the gram negative bacteria (*Salmonella* and *E. coli*) tested in this study, which may have contributed to the favorable results observed in the *sushi* samples.

**Keywords:** sushi, food microbiology, *Staphylococcus aureus*, vinegar, minimum inhibitory concentration

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Sequência dos primers e tamanho dos produtos amplificados na PCR para identificação dos genes <i>Nuc</i> e <i>MalB</i> .....	25
<b>Tabela 2</b> - Análises microbiológicas das amostras de sushis.....	28
<b>Tabela 3</b> - Análises moleculares das amostras de sushi.....	31
<b>Tabela 4</b> - Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Inibitória Mínima (CIM) do vinagre para as bactérias testadas.....	32

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO A</b> - Normas de submissão para a revista higiene alimentar.....	44
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
G	gramas
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods
LB	Luria Bertani
mL	mililitros
NMP	Número Mais Provável
°C	grau Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SS	Salmonella Shigella
SUS	sistema Único de Saúde
TSI	Três Açúcares e Ferro
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
XLD	Xilose-Lisina-Desoxicolato

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1. Culinária japonesa e o consumo de sushi no Brasil .....	11
1.2. Qualidade microbiológica de sushi e doenças transmitidas por alimentos .	12
1.3. Legislação brasileira e limites microbiológicos para sushis .....	15
1.4. Uso da PCR na identificação de espécies de bactérias patogênicas .....	16
1.5. Atividade antimicrobiana do vinagre .....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
2.1. Objetivo geral.....	19
2.2. Objetivos específicos .....	19
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>19</b>
<b>4. ARTIGO ELABORADO CONFORME AS NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA HIGIENE ALIMENTAR</b> .....	<b>20</b>
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
5.1. Coleta, preparo das amostras e análises microbiológicas .....	23
5.2. Identificação molecular de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> .....	25
5.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do vinagre pelo método de macrodiluição em caldo ...	26
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>27</b>
6.1 Avaliação da qualidade microbiológica dos sushis .....	27
6.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do vinagre pelo método de macrodiluição em caldo ...	31
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO</b> .....	<b>34</b>
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>37</b>
<b>10. ANEXOS</b> .....	<b>44</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Culinária japonesa e o consumo de sushi no Brasil

No Japão, a expectativa de vida aumentou consideravelmente nos últimos anos e atualmente possui os maiores índices de longevidade do mundo. Em 2012, segundo a organização mundial de saúde (OMS), as mulheres japonesas atingiram expectativa de vida de 87 anos. Isso se deve a vários fatores históricos, socioeconômicos e sociais, mas, principalmente a cultura dietética tradicional composta pela alta ingestão de peixes e produtos derivados da soja aliada ao baixo consumo de gordura (KUROTANI et al., 2016).

Durante o século XII, no sudeste asiático, foram descobertas técnicas de conservação do peixe através de fermentação. Nesse contexto, o arroz era usado apenas como meio de adquirir o ácido lático, substância que preservava o pescado. Com o passar dos anos o preparo do sushi sofreu diversas transformações importantes que reduziram substancialmente o tempo de produção e melhoraram o sabor (FENG, 2011).

Segundo Sato (2013), no Brasil, o sushi é um nome genérico para uma grande variedade de alimentos contendo arroz temperado, algas e peixe cru e possui formas variando entre retangular, cilíndrico ou triangular. Também é comum a adição de frutos do mar, verduras, frutas e ovo. Tradicionalmente é servido com uma raiz forte denominada *wasabi* e molho de soja, conhecido como *shoyu*.

Os japoneses chegaram ao Brasil há pouco mais de 100 anos e atualmente há cerca de 1,5 milhão de descendentes que mantem no país os elementos típicos da cultura, com ênfase na gastronomia (BRASIL, 2017). O consumo de sushi tem se tornado uma tendência entre os brasileiros (SOUZA et al., 2015).

Como resultado do desenvolvimento econômico e de grandes alterações no cotidiano das pessoas observou-se um aumento da demanda por serviços de alimentação que ofertam refeições de forma prática e rápida (SILVA et al., 2018). Os restaurantes especializados em culinária japonesa, anteriormente restritos às regiões onde predominavam os imigrantes asiáticos, tornaram-se comuns, estando hoje presentes em quase todos os *shoppings* dentro da categoria dos *fast food* (HIRATA,

2007). Associando tal informação com a introdução da culinária japonesa em estabelecimentos não especializados, como churrascarias e bufês *self service* com preparações variadas, entende-se ainda melhor por que cresce a cada dia o número de adeptos dos sushis (PROENÇA, 2010).

Em 2010, o Distrito Federal foi considerado um dos maiores mercados consumidores de pescados do país. O aumento na demanda foi o resultado da expansão do número de estabelecimentos especializados em peixes e frutos do mar, principalmente restaurantes japoneses, asiáticos e temakerias, que possuem uma participação significativa de todo o volume comercializado (ALCÂNTARA, 2009; BORGES, 2010).

Como consequência dessa demanda, a preocupação com a segurança alimentar de alimentos como o sushi é crescente, pois se trata de um produto altamente perecível. Por esse motivo, essa iguaria está mais susceptível a contaminações por bactérias, requerendo condições higiênico-sanitárias adequadas para seu preparo. A contaminação dos sushis pode ocorrer tanto na matéria prima, como durante o processamento, sendo de grande importância o uso de técnicas corretas de manipulação (RODRIGUES et al., 2012; VALLANDRO et al., 2011).

## **1.2. Qualidade microbiológica de sushi e doenças transmitidas por alimentos**

Segundo a OMS as doenças transmitidas por alimentos (DTA) são uma das causas mais relevantes de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Essas enfermidades são causadas pelo consumo de água ou alimentos contaminados. Existem inúmeros tipos de DTA e a maioria das infecções é causada por bactérias, vírus e parasitas (LENTZ et al., 2018).

Pesquisas realizadas pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde entre 2000 e 2015, revelaram que mais de 99 mil pessoas foram expostas a doenças transmitidas por alimentos no Brasil e que em 90,5% dos casos, os agentes etiológicos relacionados aos surtos foram, respectivamente, as bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2015).

Os alimentos à base de pescado cru podem representar risco a saúde, pois não são submetidos à cocção, processo que inviabiliza as bactérias com potencial patogênico. Ao preparar o sushi, o contato direto com as mãos dos manipuladores

pode levar a contaminação por agentes infecciosos (SOUZA et al., 2015). A ausência de boas práticas de manipulação em estabelecimentos de culinária é responsável pela grande veiculação de DTA, ocorrendo principalmente em restaurantes *self service*, que aumentam o tempo e a exposição do alimento (BIAZZOTTO; RIBEIRO; MARQUETTI, 2016).

O pescado utilizado na produção de sushi deve seguir rigorosamente os requisitos de qualidade e ser refrigerado corretamente para se adequar aos padrões de higiene, pois a contaminação pode ocorrer em qualquer parte do processo, desde a pesca até o preparo. As enterobactérias *Salmonella* sp. e *E. coli* são agentes infecciosos de reservatório animal e podem contaminar o pescado antes ou após a captura; já o manuseio inadequado pode introduzir no alimento a espécie *S. aureus*. (VALLANDRO et al., 2011; SOUSA; AMARAL; OLIVEIRA, 2012).

O correto armazenamento do pescado é de suma importância para que não ocorra o abuso da temperatura de manutenção e comprometimento da qualidade e segurança do produto. Preparações à base de pescado cru como o sushi devem seguir a legislação RDC nº216, de 15 de setembro de 2004, onde se deve conservar o produto refrigerado a temperaturas abaixo de 5°C, que não favorecem o crescimento microbiano (ALCÂNTARA, 2009).

De acordo com Sato (2013), a presença de determinados tipos de microrganismos fornece informações relevantes sobre o estado de conservação e possíveis contaminações do alimento. Existem os microrganismos que não apresentam risco a saúde, como os heterotróficos mesófilos, heterotróficos psicotrópicos, heterotróficos termófilos, bolores e leveduras. Há também os que oferecem um risco baixo, tais como coliformes totais e coliformes termotolerantes.

Coliformes totais são bacilos gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, com capacidade de produzir gás a partir do processo de fermentação de lactose, em temperaturas de 35-37°C no período de 24-48 horas. Contagens elevadas de coliformes totais evidenciam possíveis problemas higiênicos no processamento (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Com processos adequados de sanitização e de cocção é possível diminuir os coliformes, sendo assim, a presença elevada desses revela condições de higiene inadequadas no processamento, armazenamento, pós-processamento e distribuição. Os fatores que contribuem para a elevada presença de coliformes nos alimentos são: a contaminação cruzada entre

alimentos crus e alimentos cozidos, o uso de objetos de cozinha não desinfetados e mãos não higienizadas (CARDOSO, 2014).

O grupo de coliformes termotolerantes são bacilos gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Essas bactérias possuem como principal característica a capacidade de fermentar a lactose em temperaturas de 44,5 a 45,5°C em aproximadamente 24 horas, com produção de gás (SILVA *et al.*, 2018; CONAMA, 2005). A presença das bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes, cujo habitat da maioria é o trato intestinal do ser humano e de outros animais homeotermos, indica contaminação de origem fecal do alimento, visto que a população deste grupo é constituída de alta proporção de *Escherichia coli* (GERMANO e GERMANO, 2008).

O gênero de maior relevância na família *Enterobacteriaceae* é a *Salmonella* sp., um bacilo pequeno, móvel, fermentador de glicose com produção de gás, mas que geralmente não fermenta lactose nem sacarose. Seu reservatório natural é o intestino de aves e mamíferos, e é através das fezes que esse microrganismo contamina o ambiente aquático, alcançando assim, peixes e frutos do mar (BRASIL, 2011; SATO, 2013). É importante ressaltar que no Brasil não é aceito em pescados crus, refrigerados ou congelados a presença da *Salmonella* spp. A presença de *Salmonella* em produtos alimentícios preparados sem tratamento térmico é uma preocupação para a saúde pública, uma vez que esse agente está envolvido em diversos casos de surtos alimentares registrados em todo o mundo (BRASIL, 2001).

*Staphylococcus aureus* são bactérias Gram-positivas que fazem parte da família *Micrococcaceae* e na morfologia são observadas em agrupamentos irregulares. São células imóveis, que não produzem esporos e são anaeróbios facultativos. A temperatura ótima de multiplicação é de 30 a 37°C. *S. aureus* é uma espécie de grande importância nas DTA por ser o causador de intoxicação alimentar de grande frequência em todo o mundo (GATTI-JÚNIOR, 2011; SANTIAGO *et al.*, 2013).

A bactéria *Staphylococcus aureus* habita com frequência a nasofaringe do ser humano, a partir da qual pode contaminar as mãos do homem e penetrar no alimento, causando a intoxicação alimentar estafilocócica. O patógeno é encontrado em 30% da população humana e um a dois terços destes possuem cepas enterotoxigênicas, produtoras de toxina proteica termoestável (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

A intoxicação causada pelo *S. aureus* é desencadeada pelo consumo de enterotoxinas que são produzidas por esta bactéria durante seu processo de multiplicação no alimento. A presença de *S. aureus* no pescado ocorre, predominantemente, por meio da manipulação (GERMANO & GERMANO, 2008; VIEIRA et al., 2004).

### **1.3. Legislação brasileira e limites microbiológicos para sushis**

Países em desenvolvimento tem priorizado o conhecimento acerca da qualidade higiênicossanitária dos alimentos, que é vista como um aspecto importante da segurança alimentar, dado que as doenças veiculadas por alimentos contribuem para altos índices de morbidade (SOUZA et al., 2015).

A Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990 que instituiu o Sistema único de saúde (SUS) assegura no seu artigo 6º, inciso VIII, a fiscalização e a inspeção de alimentos, água e bebidas, para consumo humano, bem como o controle e a fiscalização de serviços, produtos e substâncias que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo (BRASIL, 1990). Portanto, o Ministério da Saúde é responsável por realizar o controle e fiscalização de procedimentos, produtos e substâncias dedicados à saúde, além de exercer ações de vigilância sanitária (ALCÂNTARA, 2009).

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou a partir da RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001 o regulamento técnico de critérios e padrões microbiológicos para alimentos, com o objetivo de proteção da saúde da população e a regulamentação dos padrões microbiológicos para produtos alimentícios. O item 22 e subitem b, que é classificado como “Pratos Prontos para o Consumo (Alimentos Prontos de Cozinha, Restaurantes e Similares)” a base de carnes, pescados e similares crus a base de carnes, pescados e similares crus (quibe cru, carpaccio, sushi, sashimi, etc.)”, determina os padrões e limites de tolerância para Coliformes termotolerantes a 45°C, Estafilococos coagulase positiva e *Salmonella* sp. Nesse caso, os valores máximos permitidos são: coliformes a 45°C deve ser menor ou igual a 10<sup>2</sup> NMP/g, *S. aureus* deve ser menor que 10<sup>3</sup> UFC/g e, obrigatoriamente, ausência de *Salmonella* sp. em 25 g de amostra (BRASIL, 2001).

#### 1.4. Uso da PCR na identificação de espécies de bactérias patogênicas

Em 1993, o americano Kary Banks Mullis ganhou o prêmio Nobel de química pelo desenvolvimento da técnica de biologia molecular denominada reação em cadeia da polimerase, em inglês, Polymerase Chain Reaction (PCR), que amplifica sequências do DNA de qualquer organismo vivo. A PCR é considerada um método altamente sensível em que sequências específicas de DNA ou RNA são amplificadas até que sejam obtidas milhões de cópias da sequência alvo (GANDRA et al., 2008).

A amplificação de DNA por PCR é uma técnica que permite obter milhões de cópias de um segmento específico de DNA por meio da ação da enzima termoestável Taq DNA polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) sobre um DNA molde. É realizada em um equipamento automatizado e computadorizado, denominado termociclador, que promove a alternância de temperaturas por determinados períodos, possibilitando a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do DNA (GANDRA et al., 2008). Por meio da PCR possível a produção de muitas cópias de sequências específicas de ácidos nucleicos (ANDRADE et al., 2010).

As etapas básicas envolvem a variação de temperatura por ciclos. Primeiramente, é realizado a desnaturação da fita de DNA resultando em um molde de fita simples. Essa fase dura aproximadamente 1 minuto, em temperaturas variando entre 92°C a 96°C. A segunda etapa consiste no anelamento, em que a reação é resfriada em 58°C a 65°C para que os *primers* liguem-se a região complementar da fita de DNA, ocasionando a duplicação, essa fase dura de 30 segundos a 1 minuto. Por fim, a amplificação ocorre ao elevar novamente a temperatura a 72°C para que a enzima *Taq polimerase* sintetize novas fitas de DNA a partir dos *primers*, utilizando como substrato da reação os quatro ácidos nucleicos. Essa etapa possui uma duração entre 45 segundos a 1 minuto (CAMARGO; SILVA, 2011).

A técnica de PCR é utilizada para a detecção e quantificação de uma grande variedade de microrganismos, como bactérias, fungos e vírus. Entre esses, destaca-se os patógenos de origem alimentar responsáveis por índices elevados de morbidade e mortalidade em todo o mundo, tais como *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli* e *S. aureus* (POSTOLLEC et al., 2011). A técnica de PCR vem ganhando

destaque para a detecção de microrganismos e quando comparada com os métodos convencionais se mostra altamente sensível e específica, produzindo resultados em poucas horas e serve também como confirmação e esclarecimento, quando os resultados dos testes convencionais geram dúvidas (ANDRADE et al., 2014; RODRIGUES et al., 2011).

Os métodos convencionais de isolamento para *Salmonella* spp. em alimentos requerem de quatro a sete dias. Isto inclui etapas de pré-enriquecimento não seletivo, seguido de enriquecimento seletivo e plaqueamento em ágar seletivo e diferencial, além de confirmação bioquímica e sorológica de colônias suspeitas. Diante do tempo e trabalho empregados no método convencional, ferramentas de identificação mais rápidas para indicação de presença ou ausência de *Salmonella* spp. em alimentos tornam-se bem interessantes (ALMEIDA et al., 2013).

No estudo de GONÇALVES et al. (2014), os testes baseados em PCR foram mais sensíveis que os métodos de cultura convencionais para detecção de *Salmonella* em alimentos. E no estudo de MESTER; SCHODER; WAGNER (2014), os testes baseados em PCR foram mais específicos que os testes de imunoensaio para detecção de *Salmonella* e *L. monocytogenes* em alimentos.

Resultado similar foi obtido por Dickel et al. (2005), onde os autores compararam o método microbiológico convencional, ELISA e PCR para detecção de *Salmonella* spp. em amostras de frango contaminadas artificialmente. Entre as três técnicas, o método microbiológico convencional foi o que detectou o menor número de amostras positivas. Tanto ELISA quanto PCR foram superiores na detecção de *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Gallinarum*.

### **1.5. Atividade antimicrobiana do vinagre**

O vinagre é definido como uma solução aquosa contendo de 4 a 10% de ácido acético e resulta da fermentação acética do fermentado alcoólico de mosto de frutas, cereais ou vegetais. A produção do vinagre acontece a partir de dois processos diferentes resultantes da ação de microrganismos: 1) fermentação alcoólica, pela ação de leveduras *Saccharomyces* sobre o mosto e 2) fermentação acética, pela ação de bactérias aeróbias do gênero *Acetobacter* (MARQUES et al, 2010).

O constituinte mais importante do vinagre é o ácido acético (4 a 10%), que é classificado como um ácido orgânico. O vinagre é considerado eficaz no uso como agente sanitizante contra patógenos de origem alimentar. Sua atividade antimicrobiana está relacionada ao seu pH ácido, concentração e força iônica, mas também depende da espécie, fase de crescimento, temperatura ótima e capacidade de resistência a ácido de cada microrganismo (CHANG; FANG, 2007).

De acordo com Kadiroğlu (2018), um ácido orgânico em sua forma não dissociada tem a capacidade de atravessar livremente a membrana celular de um microrganismo. Quando está dentro da célula em que o pH é mantido próximo de 7, o ácido vai se dissociar e, conseqüentemente, reduzir o pH, causando inibição ou até a morte do microrganismo. Conforme a legislação brasileira, o vinagre, independente da forma de obtenção, deve conter no mínimo 40 gramas de ácido acético por litro de solução (BRASIL, 2012).

No estudo de Rodrigues et al. (2012) observou-se que os sushis, tanto de atum como de salmão, apresentam valores de pH menores em relação aos respectivos sashimis. Esses menores valores de pH ocorrem pela adição de vinagre (ácido acético) ao arroz no preparo do sushi. Este ácido resulta em uma diminuição dos valores de pH do sushi, podendo contribuir na conservação do pescado, uma vez que certos microrganismos não possuem capacidade de crescer em pH mais ácido.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de sushis comercializados na cidade de Brasília e região.

### 2.2. Objetivos específicos

- Realizar as análises bacteriológicas: contagem total dos microrganismos mesófilos e psicotróficos, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus*, pesquisa de *Escherichia coli* e pesquisa de *Salmonella* sp.
- Realizar genotipagem através da técnica de PCR para confirmação dos microrganismos *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* spp.
- Realizar testes para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) do vinagre de arroz utilizando o método de macrodiluição em caldo.

## 3. JUSTIFICATIVA

Hoje é frequente na cultura gastronômica brasileira o consumo de alimentos preparados a base de peixe cru resultante da recente popularidade de pratos tradicionais japoneses como o sushi e o sashimi. O sushi está sujeito à contaminação por vários microrganismos patogênicos, sendo um alimento com potencial risco de transmissão de doenças para o homem, devido ao constante contato manual na sua preparação e de ser consumido cru. As análises microbiológicas das amostras de sushis poderão determinar a sua qualidade, de forma a verificar se esses alimentos prontos para consumo estão sendo comercializados nesses estabelecimentos com segurança alimentar para o consumidor.

#### 4. ARTIGO ELABORADO CONFORME AS NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA HIGIENE ALIMENTAR

##### AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE SUSHIS COMERCIALIZADOS NO DISTRITO FEDERAL

Flávia Bianca Amaral Alves, Daniela Castilho Orsi, Izabel Cristina Rodrigues da Silva

Universidade de Brasília (UNB/FCE), Faculdade de Farmácia, Laboratório de Controle de Qualidade, Ceilândia, Brasília - DF, Brasil.

#### RESUMO

Neste estudo, foi avaliada a qualidade microbiológica de sushis comercializados em estabelecimentos especializados e não especializados em culinária oriental do Distrito Federal. Para as análises microbiológicas foram coletadas 12 amostras de sushis, sendo sete provenientes de restaurantes especializados em comida oriental e cinco de embalagens dispostas em balcões refrigerados de supermercados e padarias. As análises realizadas foram: contagem total de bactérias mesófilas e psicrófilas, determinação de coliformes totais e coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus*, pesquisa de *Escherichia coli* e de *Salmonella* spp., além de identificação molecular de *E. coli* e *S. aureus* através da técnica de PCR. Foi realizado ainda um estudo da atividade antimicrobiana do vinagre de arroz (ingrediente usado na elaboração do sushi) através do método de macrodiluição em caldo para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) desse composto. Os resultados mostraram que as amostras de sushis coletadas em restaurantes especializados em culinária oriental estavam mais contaminadas com coliformes termotolerantes e bactérias *S. aureus* do que as amostras coletadas em embalagens dos supermercados e padarias. Dentre as 12 amostras de sushi analisadas, 6 amostras (50%) apresentaram bactérias *S. aureus*, sendo que 2 amostras (16,7%) excederam o limite aceitável estabelecido pela legislação brasileira (máximo de 3,69 log UFCg<sup>-1</sup>) e, portanto, estavam impróprias para o consumo. As outras 10 amostras (83,4%) estavam em condições microbiológicas

aceitáveis para o consumo de acordo com a legislação brasileira, indicando uma boa procedência da matéria prima usada na produção dos sushis e técnicas corretas de preparo desse alimento. O vinagre de arroz testado apresentou efeito bactericida (CBM) e bacteriostático (CIM) tanto para as bactérias gram positivas (*S. aureus* e *B. cereus*) quanto para as bactérias gram negativas (*Salmonella* e *E. coli*) testadas neste estudo, o que pode ter contribuído para os resultados positivos observados nas amostras de sushi.

**Palavras-chave:** sushi, microbiologia de alimentos, *Staphylococcus aureus*, vinagre, concentração inibitória mínima, concentração bactericida mínima

## ABSTRACT

In this study, the microbiological quality of sushis marketed in specialized and non-specialized establishments in oriental cuisine of the Federal District was evaluated. For the microbiological analysis, 12 samples of sushis were collected, seven of them coming from restaurants specialized in oriental foods and five from packages placed in refrigerated counters of supermarkets and bakeries. The analyzes realized were total counting of mesophilic and psychrotrophic bacteria, determination of total coliforms and thermotolerant coliforms, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* count, as well as molecular identification of *E. coli* and *S. aureus* through PCR technique. A study of the antimicrobial activity of rice vinegar (ingredient used in the elaboration of *sushi*) was carried out using the broth macrodilution method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of this compound. The results showed that samples of *sushis* collected in restaurants specialized in oriental cuisine were more contaminated with thermotolerant coliforms and *S. aureus* bacteria than samples collected in supermarket and bakery packages. Among the 12 sushi samples analyzed, 6 samples (50%) had *S. aureus* bacteria, and 2 of them (16.7%) exceeded the acceptable limit established by Brazilian legislation (maximum of  $3.69 \log \text{ UFCg}^{-1}$ ) and, therefore, were improper for consumption. The other 10 samples (83.4%) were in acceptable microbiological conditions for consumption according to the Brazilian legislation, indicating a good origin of the raw materials used in the preparation of the *sushis* and the use of suitable

techniques to prepare that food. The rice vinegar tested showed bactericidal (MBC) and bacteriostatic (MIC) effect for both the gram positive bacteria (*S. aureus* and *B. cereus*) and the gram negative bacteria (*Salmonella* and *E. coli*) tested in this study, which may have contributed to the favorable results observed in the *sushi* samples.

**Keywords:** sushi, food microbiology, *Staphylococcus aureus*, vinegar, minimum inhibitory concentration

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem-se observado nas grandes cidades brasileiras, uma mudança no perfil alimentar da população, pois o hábito de consumir pratos orientais contendo peixe cru, como sushi e sashimi, tem se tornado cada vez mais frequente. A busca por um padrão alimentar saudável favorece o consumo de pratos japoneses, pois os mesmos são coloridos, com grande variedade de vegetais e pouca ou nenhuma cocção, o que ajuda na preservação do valor nutritivo dos alimentos (RODRIGUES et al., 2012).

O sushi teve origem nos países asiáticos, como forma de conservação do peixe, onde este era consumido fermentado e o arroz era usado no processo de fermentação para a produção do ácido lático. Com o passar do tempo, essa técnica sofreu modificações e devido ao longo tempo de espera para que a fermentação do sushi ocorresse, começou a ser acrescentado vinagre ao arroz. Assim o tempo de preparo do sushi diminuiu e o arroz passou a ser consumido junto com o peixe (FENG, 2011).

A partir do século 20 houve a difusão do sushi para os países do ocidente, onde este não costuma ser um alimento fermentado. O sushi geralmente é composto pelo arroz japonês avinagrado, contendo cobertura ou recheio de peixes geralmente crus e vegetais. O tipo mais comum de apresentação do sushi é um bolinho de arroz moldado manualmente, temperado com vinagre, sal e açúcar enrolado externamente com folha de alga marinha denominada *nori* e contendo como recheio peixes, legumes, frutas ou ovos (LORENTZEN et al., 2012; SANTOS et al., 2012).

Com o crescente aumento do consumo dos sushis, aumentou-se a preocupação com os perigos inerentes a esse alimento na veiculação de doenças

transmitidas por alimentos (VIEIRA, 2004). O sushi é um prato a base de peixe cru. A matéria prima de boa qualidade é essencial para a segurança desse alimento, pois a microbiota do pescado reflete a água onde ele vive. O lançamento de esgotos sem tratamento nas águas de lagos rios e mar contamina o pescado com bactérias patogênicas como *Salmonella*, *Shigella* e *E. coli* (SOUZA et al., 2015; ICMSF, 2005). Outro fator preocupante é o uso dos vegetais crus nos recheios dos sushis. Esses vegetais aumentam as possibilidades de contaminação, pois erros quanto à higienização e manipulação podem veicular microrganismos patogênicos (LORENTZEN et al., 2012; SANTOS et al., 2012).

Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010), os alimentos prontos para o consumo (como é o caso do sushi) são um dos principais responsáveis por surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no país. Dentre os fatores que contribuem para ocorrência de surtos de DTA, destaca-se: a falta de higiene pessoal dos manipuladores, a contaminação cruzada, a limpeza inadequada dos utensílios e a utilização de matéria prima de má qualidade (GERMANO & GERMANO, 2008).

Assim, o presente estudo teve como objetivo a avaliação da qualidade microbiológica de sushis comercializados na cidade de Brasília e região, Distrito Federal.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Coleta, preparo das amostras e análises microbiológicas**

Para as análises microbiológicas, foram coletadas 12 amostras de sushis (7 amostras de restaurantes e 5 amostras de embalagens dispostas em balcões refrigerados de supermercados e padarias) em 12 diferentes estabelecimentos comerciais do Distrito Federal. As amostras foram adequadamente acondicionadas e conduzidas ao Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia (UNB/FCE), onde foram imediatamente analisadas.

Todas as amostras foram analisadas em três repetições, ou seja, foram retiradas três alíquotas de cada embalagem e os resultados foram expressos como média em log de UFC/g. Para o preparo das amostras, foram pesadas 25 g de cada amostra e diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v). O material foi homogeneizado, obtendo-se desta forma a primeira diluição ( $10^{-1}$ ). A partir da primeira diluição obtiveram-se as demais diluições decimais (até  $10^{-3}$ ).

Para a contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas, as diluições de cada amostra foram semeadas, pelo método de superfície, em placas de Petri contendo o meio de cultivo Ágar Padrão para Contagem. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h para bactérias mesófilas e a 7°C  $\pm$  1°C por 7 dias para bactérias psicotróficas. Os resultados obtidos foram expressos em log UFC/g.

Para a determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes as amostras foram analisadas conforme a técnica de tubos múltiplos, iniciando-se com o teste presuntivo, que consiste na inoculação de cada diluição das amostras em caldo Lactosado. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 h. A positividade do teste caracterizou-se pela turvação do caldo com a produção de gás nos tubos de Durham. Alíquotas dos tubos positivos no teste presuntivo foram inoculadas, simultaneamente, em tubos de ensaio contendo caldo verde brilhante bile lactose a 2% (para a confirmação de coliformes totais) e caldo *Escherichia coli* (para a confirmação de coliformes termotolerantes). Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h para o teste de coliformes totais e em banho-maria a 45°C por 24 h para o teste de coliformes termotolerantes. Os resultados obtidos foram expressos em log NMP/g.

Para a contagem de *Staphylococcus aureus*, cada uma das diluições das amostras foi semeada, pelo método de superfície, em placas de Petri contendo o meio de cultivo Agar Sal. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. As colônias suspeitas de *S. aureus* foram reisoladas em tubos de Agar Sal Manitol e submetidas à coloração de gram. As colônias suspeitas de *S. aureus* foram submetidas à identificação molecular através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., a diluição  $10^{-1}$  das amostras foi incubada à 37°C por 24 h. Após a incubação, pipetou-se 1 ml das alíquotas do caldo de enriquecimento para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo seletivo tetracionato com iodo. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 24 h. Após a

incubação, procedeu-se à técnica de isolamento, onde a partir de cada tubo, semearam-se placas de Petri contendo o meio de cultivo Ágar Salmonella Shigella (SS) e/ou Agar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD). As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. As colônias suspeitas de *Salmonella* spp. foram transferidas para tubos inclinados contendo o meio de cultivo Agar TSI (três açúcares e ferro).

## 5.2. Identificação molecular de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

As bactérias isoladas suspeitas de serem *S. aureus* e *E. coli* foram identificadas através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para a identificação de *S. aureus* foi utilizado o fragmento de 401 pares de base referente ao gene *Sec*. E para a identificação de *E. coli* foi utilizado o fragmento de 113 pares de base referente ao gene *MalB*. Os primers construídos para este estudo estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Sequência dos primers e tamanho dos produtos amplificados na PCR para identificação dos genes *Nuc* e *MalB*

Primer	Sequência 5' - 3'	Produto amplificado	Espécie
<i>Sec</i> foward	TTTTACACCCAACGTATTAGCAGA		
<i>Sec</i> reverse	TCCATTATCAAAGTGGTTTCC	401 pb	<i>S. aureus</i>
<i>MalB</i> foward	TCTATGGGCTGTGACTGCTG		
<i>MalB</i> reverse	GGCATCCCCATGATGTAGTT	113 pb	<i>E. coli</i>

As colônias isoladas suspeitas de serem *S. aureus* ou *E. coli* foram inoculadas, individualmente, em caldo Brain Heart Infusion e incubadas a 37°C por 18 h. A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo proposto no kit comercial Plasmid DNA purification MACHEREY-NAGEL®. A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram determinadas por eletroforese em gel de agarose, em comparação com o padrão de massa molecular DNAI/HindIII marcador de 100 pb (JENA®). Após a extração do DNA, a amplificação de fragmentos de genes foi realizada utilizando o termociclador Techne® modelo TC-512. As condições de termociclagem foram 50°C por 2 min., 95°C por 2 min. e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg., seguida

de 60°C por 30 seg., para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 30 seg. para a extensão dos fragmentos. Foram utilizados 2,5 µL de tampão (10 mM de Tris e 50 mM de KCl), 0,7 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µL de Taq-Polimerase (Cenbiot<sup>®</sup>, 5 U/µL), 1,5 µL de oligonucleotídeos forward e reverse (10 µM), completando com água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação, com a amplificação de 10 ng de DNA extraído da amostra bacteriana. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultra-violeta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100 pb DNAI/HindIII (JENA<sup>®</sup>).

### **5.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do vinagre pelo método de macrodiluição em caldo**

O método de macrodiluição em caldo foi realizado utilizando protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). De acordo com a CLSI (2015), a Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento de um microrganismo determinado por turbidez em testes de sensibilidade por diluição em caldo e de acordo com a CLSI (1999) a Concentração Bactericida Mínima (CBM) é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de reduzir a contagem microbiana em 99,9%.

Os inóculos utilizados foram cepas de bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella enteritidis* ATCC 14028. Os inóculos foram preparados através de suspensão direta do crescimento microbiano em caldo Luria Bertani (LB) com turvação equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland ( $1,0 \times 10^8$  UFC/mL) sendo ajustada entre 0,08 – 0,10 de densidade óptica a 625 nm em espectrofotômetro. Foram realizadas diluições em caldo LB das culturas na concentração de 0,5 na escala de Mc Farland na ordem de 1:150, resultando em uma concentração de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL.

O vinagre foi diluído em caldo LB em diferentes concentrações. Então, adicionou-se em tubos estéreis 1,0 mL do inóculo na concentração de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL e 1,0 mL das diferentes concentrações de vinagre, resultando em uma concentração final de bactérias de  $5,0 \times 10^5$  UFC/mL. Como controle positivo (com

crescimento das bactérias) foi utilizado 1,0 mL do inóculo na concentração de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL e 1,0 mL de caldo LB. Como controle negativo (inibição do crescimento das bactérias) foi utilizado 1,0 mL do inóculo na concentração de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL e 1,0 mL de vinagre.

Os tubos foram incubados a  $37^\circ\text{C}$  por 18 horas e para a determinação da CIM a leitura de turbidez foi realizada a 625 nm em espectrofotômetro. Para a determinação da CBM as diluições foram plaqueadas em ágar Mueller Hinton e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 18-24 horas e a CBM foi determinada na menor concentração onde não foram observadas colônias nas placas.

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 Avaliação da qualidade microbiológica dos sushis**

Neste estudo, foram analisadas 12 amostras de sushi e os resultados das análises microbiológicas estão descritos na Tabela 2. Os microrganismos considerados mesófilos multiplicam-se em temperaturas entre  $10^\circ\text{C}$  a  $48^\circ\text{C}$ , sendo que a temperatura ótima varia entre  $30^\circ\text{C}$  e  $37^\circ\text{C}$  (SATO, 2013). Segundo Franco e Landgraf (2008), a quantificação de microrganismos mesófilos tem como objetivo analisar o estado de contaminação de um alimento e é frequentemente utilizado como indicador da qualidade higiênica dos alimentos, sendo capaz de fornecer informações sobre o seu tempo útil de conservação.

Já as bactérias psicrófilas são capazes de proliferarem em temperaturas abaixo de  $7^\circ\text{C}$ , porém, a temperatura ideal de crescimento está entre  $20^\circ\text{C}$  e  $30^\circ\text{C}$ . A contagem de microrganismos psicrófilos avalia o grau de deterioração de alimentos refrigerados (FERREIRA; LIMA; COELHO, 2014). De acordo com Bartolomeu et al. (2011) esses microrganismos em grandes quantidades são responsáveis pela redução da vida de prateleira de alimentos à base de pescados, pois constituem seus principais deterioradores.

**Tabela 2 - Análises microbiológicas das amostras de sushis**

Amostras de sushi	Bactérias mesófilas (log UFCg <sup>-1</sup> )	Bactérias psicotróficas (log UFCg <sup>-1</sup> )	Coliformes totais (log NMPg <sup>-1</sup> )	Coliformes termotolerantes (log NMPg <sup>-1</sup> )	Salmonella entérica	S. aureus (log UFCg <sup>-1</sup> )
1 GM*	4,81 ± 0,14	5,46 ± 0,62	2,53 ± 0,45	0,48***	ND	<b>5,30 ± 0,72</b>
2 GM2*	3,40 ± 0,17	5,44 ± 0,15	1,03 ± 0,12	0,53 ± 0,52	ND	ND
3 RC*	3,45 ± 0,14	3,82 ± 0,18	1,50 ± 0,69	1,11 ± 0,56	ND	2,45 ± 0,21
4 K*	3,26 ± 0,31	4,08 ± 0,16	ND	ND	ND	ND
5 SL*	5,72 ± 0,06	6,06 ± 0,07	1,29 ± 0,25	1,38 ± 0,19	ND	<b>4,57 ± 0,28</b>
6 MW*	3,71 ± 0,14	4,69 ± 0,27	2,18 ± 0,56	0,57 ± 0,58	ND	2,96 ± 0,51
7 SL2*	2,10 ± 0,17	3,52 ± 0,38	1,22 ± 0,22	0,37 ± 0,32	ND	3,15 ± 0,22
8 PD**	ND	3,74 ± 0,72	0,15***	ND	ND	ND
9 PV**	2,61 ± 0,28	4,76 ± 0,22	0,26***	0,26***	ND	ND
10 C**	2,89 ± 0,19	2,92 ± 0,15	0,28 ± 0,50	ND	ND	ND
11 PA**	2,80 ± 0,70	4,89 ± 0,07	ND	ND	ND	ND
12 PD2**	3,04 ± 0,08	4,39 ± 0,10	0,37 ± 0,32	0,18***	ND	2,66 ± 0,10

\*amostras de restaurantes; \*\*amostras de embalagens dispostas em balcões refrigerados de supermercados e padarias; \*\*\* = não foi possível calcular o desvio padrão, pois apenas uma bateria de tubos apresentou resultados positivos; ND = não detectado.

A legislação brasileira que dispõe sobre padrões microbiológicos para alimentos não estabelece padrões para as classes de bactérias mesófilas e psicotróficas, porém, segundo ICMSF (1986) a contagem máxima para esses microrganismos em produtos à base de peixe deve ser de 7 log UFC/g (10<sup>7</sup> UFCg<sup>-1</sup>). No presente estudo, a contagem total de bactérias mesófilas (2,10 a 5,72 log UFCg<sup>-1</sup>) e psicotróficas (2,92 a 6,06 log UFCg<sup>-1</sup>) mantiveram-se dentro dos limites aceitáveis.

De Souza et al. (2015) e Mouta et al. (2014) encontraram resultados semelhantes a este estudo ao investigar a qualidade de sushis servidos, respectivamente, nas cidades de João Pessoa/PB e de Sobral/CE. No estudo de Souza et al (2015) a contagem de bactérias aeróbias mesófilas variou de 3,43 a 5,55 log UFCg<sup>-1</sup> e no estudo de Mouta et al (2014) a contagem variou de 3,86 a 4,25 log UFCg<sup>-1</sup>.

O termo coliforme total é utilizado para indicar o grupo de bactérias Gram negativas, anaeróbias facultativas em forma de bastonetes pertencentes a família *Enterobacteriaceae*. Esse parâmetro microbiológico é fundamental para a avaliação

de qualidade higiênicossanitária de água e alimentos. O grupo dos coliformes termotolerantes é um subgrupo dos coliformes totais e possui como principal representante a bactéria *Escherichia coli*. Sua presença em elevadas concentrações indica falhas na higiene dos processos de manipulação e contaminação fecal. (BATISTA et al., 2017; SATO, 2017).

A legislação brasileira não estabelece valores padrões em relação ao grupo dos coliformes totais, entretanto, de acordo com o ICMSF (1986), o valor máximo preconizado é de 3 log NMPg<sup>-1</sup>. No presente estudo todas as amostras estavam dentro dos limites aceitáveis para coliformes totais. Em relação ao grupo dos coliformes termotolerantes, a RDC nº 12/2001 que regulamenta os padrões microbiológicos para alimentos estabelece o valor máximo de 2 log NMPg<sup>-1</sup> para coliformes a 45°C em sushis (BRASIL, 2001).

No presente estudo das 12 amostras de sushi analisadas, 8 amostras (66,7%) tiveram a presença de coliformes termotolerantes, porém essas amostras estavam dentro dos limites aceitáveis para coliformes termotolerantes estabelecidos pela legislação brasileira (máximo de 2 log NMPg<sup>-1</sup>). As amostras de sushis coletadas em restaurantes estavam mais contaminadas com coliformes termotolerantes do que as amostras coletadas em embalagens dos supermercados e padarias. Das 7 amostras de sushi coletadas em restaurantes, 6 amostras estavam contaminadas com coliformes termotolerantes (85,7%). E das 5 amostras de sushi coletadas em supermercados e padarias, 2 amostras estavam contaminadas com coliformes termotolerantes (40,0%).

Guimarães, Silva e Guimarães (2016) ao analisarem amostras de sushis coletadas em estabelecimentos de comida japonesa nas cidades de Crato e Juazeiro do Norte/CE, verificaram que 80% das amostras apresentaram contagem elevada para coliformes totais. Porém para o grupo dos coliformes termotolerantes todas as amostras estavam em conformidade com a legislação. Em contrapartida, no estudo de Montanari et al. (2015), as amostras de sushis coletadas em restaurantes japoneses no município de Ji-Paraná/RO mostraram elevada contaminação por coliformes termotolerantes, sendo que 47% das amostras excederam os limites aceitáveis para coliformes termotolerantes estabelecidos pela legislação brasileira (máximo de 2 log NMPg<sup>-1</sup>).

A *Salmonella* spp. é um bacilo gram-negativo presente no trato gastrointestinal de aves, répteis e mamíferos. Quando alcançam o meio ambiente podem contaminar águas e solo. Nos últimos anos foi encontrada em pescados, carnes, leite cru, hortaliças, ovos e seus produtos. (SANTIAGO, 2013). No Brasil, em sushi não se tolera a presença de *Salmonella* spp. (BRASIL, 2001).

Como observado na Tabela 2, em nenhuma das amostras de sushi pesquisadas neste estudo foi verificada a presença de *Salmonella*. Alcântara (2009) relatou resultados similares a este estudo e também não identificou *Salmonella* em amostras de sushi servidos em restaurantes da cidade de Fortaleza/CE. Porém, resultados diferentes foram relatados por De Souza et al (2015) que identificaram *Salmonella* em duas amostras de sushi (13%), comercializados na cidade de João Pessoa/PB, indicando a necessidade de um controle mais rígido no preparo desses alimentos pelos manipuladores.

Outra bactéria que indica níveis de higiene relacionados a manipulação de alimentos é *Staphylococcus aureus*, que quando presente em elevadas concentrações nos alimentos são capazes de produzir enterotoxinas causadoras de intoxicação alimentar se ingeridas pelo homem (SATO, 2017). Segundo a legislação vigente, alimentos como o sushi com valores de *S. aureus* superiores a  $3,69 \log \text{ UFCg}^{-1}$  são classificados como impróprios para o consumo (BRASIL, 2001).

Neste estudo das 12 amostras de sushi analisadas, 6 amostras (50%) apresentaram bactérias *S. aureus*, sendo que 2 amostras (16,7%) excederam o limite aceiável para *S. aureus* de  $3,69 \log \text{ UFCg}^{-1}$  e, portanto, estavam impróprias para o consumo. Essas amostras impróprias para o consumo eram provenientes dos restaurantes especializados em culinária oriental. As amostras de sushis coletadas em restaurantes estavam mais contaminadas com bactérias *S. aureus* do que as amostras coletadas em embalagens dos supermercados e padarias. Das 7 amostras de sushi coletadas em restaurantes, 5 amostras estavam contaminadas com bactérias *S. aureus* (71,4%). E das 5 amostras de sushi coletadas em supermercados e padarias, apenas 1 amostra estava contaminada com bactérias *S. aureus* (20,0%).

O sushi sofre intensa manipulação durante seu preparo, assim, a manipulação é o principal fator que determina a presença de *S. aureus* nesse tipo de alimento, uma vez que esta bactéria pode estar presente nas mãos e mucosas oro-nasal do manipulador (VALANDRO et al., 2011).

Por meio das análises moleculares foram confirmadas colônias de *S. aureus* e *E. coli* em algumas das amostras analisadas, conforme descrito na Tabela 3.

**Tabela 3** - Análises moleculares das amostras de sushi

Amostras	Bactéria e gene amplificado na PCR	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	<i>Sec</i>	-
3	<i>Sec</i>	<i>MalB</i>
5	<i>Sec</i>	<i>MalB</i>
6	<i>Sec</i>	-
7	<i>Sec</i>	-
12	<i>Sec</i>	-

Bactérias *E. coli* foram detectadas em 2 amostras de sushi pela técnica de PCR. O gene *MalB* é específico para a formação de acetaldeído e amônia a partir de etanolamina. Wang et al. (1997) usaram o gene *MalB* para detecção de *E. coli* em amostras de frutos do mar. Todos os sorotipos de *E. coli* testados tiveram amplificação para o fragmento de DNA correspondente ao gene *MalB* e não foi obtido amplificação de DNA para outras *Enterobacteriaceae* testadas (*Enterobacter* spp., *Samonella* spp. e *Yersinia enterocolitica*).

Das 12 amostras de sushi analisadas, bactérias *S. aureus* foram detectadas em 6 amostras de sushi pela técnica de PCR. O gene *seC* codifica a enterotoxina C do *S. aureus*. As toxinas estafilocócicas (*ses*) são um grupo de enterotoxinas termoestáveis e resistentes ao pH gástrico. A enterotoxina C (*seC*) é dividida nos subgrupos C1, C2 and C3 e tem papel importante na causa de intoxicação alimentar (Argudin et al., 2010; Seo et al., 2010).

## **6.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do vinagre pelo método de macrodiluição em caldo**

A maioria das amostras de sushi avaliadas neste estudo (10 amostras de 12 analisadas, 83,4%) estavam em condições microbiológicas aceitáveis para o consumo de acordo com a legislação brasileira, indicando uma boa procedência da matéria

prima usada na produção dos sushis e técnicas corretas de preparo desse alimento. O uso do vinagre no preparo dos sushis certamente contribuiu para a preservação desse alimento. Com a intenção de avaliar os efeitos antimicrobianos do vinagre, determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do vinagre pelo método de macrodiluição em caldo para cepas de bactérias ATCC. Os valores de CIM e CBM para as bactérias *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 14579, *E. coli* ATCC 25922 e *Salmonella* ATCC 14028 obtidos para o vinagre de arroz estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4** - Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Inibitória Mínima (CIM) do vinagre para as bactérias testadas

Bactérias testadas	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3,5	10,0
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	2,5	3,0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	3,0	12,5
<i>Salmonella</i> ATCC 14028	3,5	50,0

Os valores de CIM e CBM foram expressos em relação a quantidade de ácido acético no vinagre de arroz (5,0%), ou seja, em mg de ácido acético por mL.

O vinagre teve efeito bactericida (CBM) e bacteriostático (CIM) tanto para as bactérias gram positivas (*S. aureus* e *B. cereus*) quanto para as bactérias gram negativas (*Salmonella* e *E. coli*) testadas neste estudo. Os valores de CBM variaram de 3,0-50,0 mg/mL de acidez total, sendo *B. cereus* a bactéria mais sensível aos efeitos antimicrobianos do vinagre. Já os valores de CIM variaram de 2,5-3,5 mg/mL de acidez total. No estudo de Souza et al. (2018) a CBM para *E. coli* foi de 15 mg/mL de acidez total e a CIM foi de 2,5 mg/mL de acidez total. E no estudo de Niguma et al. (2016). Os resultados das CBM para *Salmonella* Typhi, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli*, obtidas com os diferentes vinagres testados variaram de 5-10 mg/mL de acidez total e a CIM foi de 5 mg/mL de acidez total para todos os vinagres e cepas testadas.

Chang e Fang (2007) mostraram que o tratamento com vinagre de arroz (50 mg/mL de ácido acético) por 5 minutos leva à redução de 7 para 3 log UFC/g de *E.*

*coli* O157:H7 em alfaces contaminadas artificialmente. E no estudo de Souza et al. (2018) amostras de alface artificialmente contaminadas com *E. coli* foram lavadas com água e imersas em solução com 15 mg/mL de ácido acético, por 15 minutos. Esse tempo foi adequado para a redução da contagem de *E. coli* nas amostras de 3,27 para 0,76 log UFC/g.

## 7. CONCLUSÃO

Neste estudo, foi avaliada a qualidade microbiológica de 12 amostras de sushis comercializados no Distrito Federal, sendo que 7 amostras eram provenientes de restaurantes especializados em comida oriental e 5 amostras eram provenientes de embalagens dispostas em balcões refrigerados de supermercados e padarias. Os resultados mostraram que as amostras de sushis coletadas em restaurantes estavam mais contaminadas com coliformes termotolerantes e bactérias *S. aureus* do que as amostras coletadas em supermercados e padarias.

Das 12 amostras de sushi analisadas, 2 amostras (16,7%) excederam o limite aceitável para *S. aureus* de 3,69 log UFCg<sup>-1</sup> e, portanto, estavam impróprias para o consumo. E a região gênica *Sec* identificada através de PCR indicou que as bactérias *S. aureus* provenientes dessas amostras eram produtoras de enterotoxinas. Essas amostras impróprias para o consumo eram provenientes dos restaurantes especializados em culinária oriental. A presença elevada de bactérias *S. aureus* nessas amostras de sushis indicam condições higiênicas inapropriadas, por se tratar de uma bactéria procedente de manipulação humana inadequada.

Apesar de 2 amostras estarem impróprias para o consumo, a maioria das amostras de sushi avaliadas neste estudo (10 amostras de 12 analisadas, 83,4%) estavam em condições microbiológicas aceitáveis para o consumo de acordo com a legislação brasileira, indicando uma boa procedência da matéria prima usada na produção dos sushis e técnicas corretas de preparo desse alimento.

O vinagre de arroz testado apresentou efeito bactericida (CBM) e bacteriostático (CIM) tanto para as bactérias gram positivas (*S. aureus* e *B. cereus*) quanto para as bactérias gram negativas (*Salmonella* e *E. coli*) testadas neste estudo, o que pode ter contribuído para os resultados favoráveis observados nas amostras de sushi.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO

ALCÂNTARA, Bernadette Matos. **Qualidade higiênicossanitária de sushi e sashimi servidos em restaurantes da cidade de Fortaleza: modismo alimentar e risco à saúde.** 2009. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Saúde Pública, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2009.

BARTOLOMEU, Dayse Aline Ferreira Silva et al. Contaminação microbiológica durante as etapas de processamento de filé de tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Archives of Veterinary Science**, v.16, n.1, p. 21-30, 2011.

BATISTA, Camila. Moura et al. Microbiological and physicochemical qualities of sushi and sashimi from Japanese Restaurants in Brazil. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 5, n. 10, p.729-735, 2017.

BRASIL, 2001. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões Microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União.

CHANG, Ju-mei.; FANG, Tony. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against E. coli O157:H7. **Food Microbiology**, v. 24, n. 2, p.745-751, 2007.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline M26-A Wayne, Pennsylvania, USA, 1999.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Tenth Edition. CLSI document M07-A10, Wayne, Pennsylvania, USA, 2015.

DE SOUZA, Thiago José Ferreira Flor et al. Microrganismos de interesse sanitário em sushis. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, n. 3, p. 274-279, 2015.

FENG, Cindy Hsin-I. The tale of *sushi*: history and regulations. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.11, 2011.

FERREIRA, Heider; LIMA, Hiago; COELHO, Thiago. Microrganismos indicadores em alimentos de origem animal. Portal UFERSA. 2014. Texto para Discussão.

FRANCO, Bernadette Dora Gombossy de Melo; LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia dos Alimentos**. Editora Atheneu, São Paulo, 2008.

GERMANO, Pedro Manuel Leal; GERMANO, **Maria Izabel Simões**. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2008. 986 p.

GUIMARÃES, Keyla. Pereira; SILVA, Raynio Markfá Rocha.; GUIMARÃES, Karina Pereira. Investigação da qualidade microbiológica de sushis comercializados nas cidades de Crato e Juazeiro do Norte - CE. **E-Ciência**, v. 4, n. 2, p.20-25, 2016.

ICMSF. **Microorganisms in foods 6: microbial ecology of food commodities**, 2 ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2005.

ICMSF. **Microorganismos de los alimentos: técnicas de análisis microbiológico**. Zaragoza: Acribia, 1984. 431p

LORENTZEN, Grete et al. Viability of *Listeria monocytogenes* in an experimental model of nigiri *sushi* of halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and salmon (*Salmo salar*). **Food Control**, v.25, p. 245-248, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010. **Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por alimentos**. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_integrado\\_vigilancia\\_doencas\\_alimentos.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf)> Acesso em: 05 set. 2018.

MONTANARI, Adriana Silva et al. Evaluation of microbiological quality of salmon sashimis, prepared and marketed in Japanese restaurants the municipally of Ji-Paraná – RO. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, p. 4-16, 2015.

MOUTA, Rosângela Maria Almeida et al. Qualidade microbiológica do sushi comercializado na cidade de Sobral/CE. **RUVRV**, v.12, n.2, p.277-284, 2014.

NIGUMA, Natália Harumi. **AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA E BACTERICIDA MÍNIMA DE VINAGRES OBTIDOS DE DIFERENTES MATÉRIAS-PRIMAS**. 2016. 4 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, 1 departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RODRIGUES, Bruna Leal et al., Qualidade físico-química do pescado utilizado na elaboração de sushis e sashimis de atum e salmão comercializados no município do Rio de Janeiro, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 5, p. 1847-1854, 2012.

SANTIAGO, Janaína de Araújo Sousa et al. Bactérias Patogênicas Relacionadas à ingestão de pescados [revisão]. **Ciências do Mar**; v.46, n.2, p.92-103, 2013.

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

SATO, Rafael Akira. **Características microbiológicas de sushis adquiridas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa**. 2013. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2013.

SOUZA, Giovanna; SPINOSA, Wilma; OLIVEIRA, Tereza. Sanitizing action of triple-strength vinegar against *Escherichia coli* on lettuce. **Horticultura Brasileira**, v. 36, p. 414-418, 2018.

WANG, R. F.; CAO, W. W.; CERNIGLIA, C. E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, n. 6, p. 727-736, 1997.

VALANDRO, Marcelo Jostmeier et al. Avaliação da qualidade microbiológica de *sashimis* à base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 2, p. 144-150, 2011.

VIEIRA, Regine Helena Silva Fernandes et al. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo: Varela; 2004.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA

ALCÂNTARA, Bernadette Matos. **Qualidade higiênicossanitária de sushi e sashimi servidos em restaurantes da cidade de Fortaleza: modismo alimentar e risco à saúde**. 2009. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Saúde Pública, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2009.

ALMEIDA, Carina et al. Detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis using real time PCR, immuno capture assay, PNA FISH and standard culture methods in different types of food samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, p. 16-22, 2013.

ANDRADE, Rodrigo et al. Ocorrência e diferenciação de espécies de *Listeria* spp. em salsichas tipo hot dog a granel e em amostras de carne moída bovina comercializadas no Distrito Federal. **Ciência Rural**, v. 44, n. 1, p. 147-152, 2014.

ANDRADE, Rodrigo et al. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter* sp, *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 4, p.741-750, dez. 2010.

BIAZZOTTO, Caroline Bina; RIBEIRO, Leandro; MARQUETTI, César. Implantação de boas práticas de manipulação em um restaurante de São Bernardo do Campo. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 30, n. 254/255, p.51-55, mar. 2016.

BORGES, Adalmyr Morais. **O mercado do pescado em Brasília**, 109 p., INFOPECA. 2010. Disponível em: [www.infopesca.org/sites/.../Informe-Brasilia.pdf](http://www.infopesca.org/sites/.../Informe-Brasilia.pdf). Acesso em: 21 set. 2018

BRASIL. 2017. Ministério do Turismo. Governo do Brasil. **Brasil tem 1,5 milhão de cidadãos de origem japonesa: Cidades brasileiras colonizadas por japoneses mantêm tradições nipônicas e são consideradas destinos turísticos**. 2017. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/editoria/turismo/2017/06/brasil-tem-1-5-milhao-de-cidadaos-de-origem-japonesa>. Acesso em: 05 set. 2018.

BRASIL, 2015. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. **Doenças transmitidas por alimentos: informações técnicas**. Disponível em: <http://foodsafetybrazil.org/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-2015> Acesso em: 05 set. 2018.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA), **Instrução Normativa número 6, de 03 de abril de 2012**. Instrução Normativa MAPA, n.6, 2012. Disponível em: <http://www.anav.com.br/legislacao.php?id=2>

BRASIL, 2011. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de Salmonella spp.: diagnóstico laboratorial do gênero Salmonella**, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL, 2001. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões Microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União. Disponível em:

<[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC\\_12\\_2001.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES)>  
S> Acesso em: 05 set. 2018.

BRASIL, 1990. **Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990.** Lei Orgânica da Saúde. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Brasília, set. 1990

CAMARGO, Cleyton Florêncio de e Silva, Paulo Roberto Queiroz da. **Aplicação das técnicas de PCR e suas técnicas derivadas em diagnóstico molecular.** 2011. Disponível em: <http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/6mostra/artigos/SAUDE/CLEYTON%20FLORENCIO%20DE%20CAMARGO%20E%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf>  
Acesso em: 05 set. 2018.

CARDOSO, Amanda Macêdo. **Avaliação das boas práticas de fabricação em restaurantes que comercializam comida japonesa no Rio de Janeiro e análise microbiológica dos sushis servidos nesses estabelecimentos.** 2014. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014

CHANG, Ju-mei; FANG, Tony. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against E. coli O157:H7. **Food Microbiology**, v. 24, n. 2, p.745-751, 2007.

CONAMA. **Resolução nº 274, de 17 de março de 2005.** Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília, Distrito Federal.

Disponível em: <[http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLUCAO\\_CONAMA\\_n\\_357.pdf](http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLUCAO_CONAMA_n_357.pdf)>. Acesso em: 05 set. 2018.

DICKEL, Elci Lotar 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 Ciência Veterinária**, v. 12, n. 1/3, p. 5-10, 2005.

FENG, Cindy Hsin-I. The tale of *sushi*: history and regulations. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.11, 2011.

FRANCO, Bernadette Dora Gombossy de Melo; LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia dos Alimentos**. Editora Atheneu, São Paulo, 2008.

GANDRA, Eliezer Ávila et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 30, n. 1, p.109-118, 2008.

GATTI-JUNIOR, Pedro. Qualidade higiênica e sanitária de tilápias provenientes de cultivo, comercializadas no varejo. 47 p. Tese de Mestrado, Centro de Aquicultura, UNESP, Campus de Jaboticabal, 2011.

GERMANO, Pedro Manuel Leal.; GERMANO, Maria Izabel Simões. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2008. 986 p.

GONÇALVES, Juliana Soares et al. Detecção de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* através de técnica de PCR. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 17, n. 4, p. 223-226, 2014.

HIRATA, Miguel. 2007, **Influência da imigração japonesa na cozinha brasileira**. Disponível em: [http://www.ipk.org.br/index.php?option=com\\_content&task=view&id=61&Itemid=70](http://www.ipk.org.br/index.php?option=com_content&task=view&id=61&Itemid=70). Acesso em: 05 set. 2018.

ICMSF. 2005. *Microorganisms in foods 6: microbial ecology of food commodities*, 2 ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2005.

KADIROGLU, Pinar. FTIR spectroscopy for prediction of quality parameters and antimicrobial activity of commercial vinegars with chemometrics. **Journal of The Science of Food and Agriculture**. p. 4121-4127, 2018.

KUROTANI, Kayo et al. Quality of diet and mortality among Japanese men and women: Japan Public Health Center based prospective study. **BMJ**, v. 352, n. 1209, p.6-14, 2016.

LENTZ, Silvia Adriana Mayer et al. *Bacillus cereus* as the main casual agent of foodborne outbreaks in Southern Brazil: data from 11 years. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 4, p.1-9, 2018.

LORENTZEN, Grete; BREILAND, Mette; COOPER, Marie; HERLAND, Hilde. Viability of *Listeria monocytogenes* in an experimental model of nigiri *sushi* of halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and salmon (*Salmo salar*). **Food Control**, v.25, p. 245-248, 2012.

MARQUES, Fabíola Pedrosa Peixoto et al. Padrões de identidade e qualidade de fermentados acéticos comerciais de frutas e vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, supl. 1, p. 119-126, 2010.

MESTER, Patrick. SCHODER, Dagmar; WAGNER, Martin. Rapid sample preparation for molecular biological food analysis based on magnesium chloride. **Food Analytical Methods**, v. 7, p. 926-934, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010. **Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por alimentos**. Disponível em: <[http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_integrado\\_vigilancia\\_doencas\\_alimentos.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf)> Acesso em: 05 set. 2018.

POSTOLLEC, Florence et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p.848-861, 2011.

PROENÇA, Rosana Pacheco da Costa. Alimentação e globalização: algumas reflexões. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 62, n. 4, 2010.

RODRIGUES, Bruna. et al., Qualidade físico-química do pescado utilizado na elaboração de sushis e sashimis de atum e salmão comercializados no município do Rio de Janeiro, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 5, p. 1847-1854, 2012.

RODRIGUES, Marjory Xavier et al. Inovação em métodos analíticos microbiológicos na indústria alimentícia. **LAJBM**, v. 2, n. 2, p. 54-81, 2011.

SANTIAGO, Janaína de Araújo Sousa et al. Bactérias patogênicas relacionadas à ingestão de pescados - revisão. **Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza, v. 2, n. 46, p. 92-103, 2013.

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

SATO, Rafael Akira. **Características microbiológicas de sushis adquiridas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa**. 2013. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2013.

SILVA, Daiane Farias da et al. Análise coproparasitológica de manipuladores de alimentos em restaurantes especializados em gastronomia japonesa. **Arquivos de Ciências da Saúde**, São José do Rio Preto, v. 25, n. 1, p.29-34, 2018.

SOUSA, Mafalda; AMARAL, Rita; OLIVEIRA, Beatriz. Good practices that contribute to sushi quality in restaurants. **Nutricias**, Porto, v. 1, n. 15, p.31-33, 2012.

SOUZA, Thiago José Ferreira Flor de et al. Microrganismos de interesse sanitário em sushis. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 3, n. 74, p.274-279, 2015.

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

VIEIRA, Regine Helena Silva dos Fernandes et al. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo: Varela; 2004.

## 10. ANEXOS

### ANEXO A - Normas de submissão para a revista higiene alimentar

01. As colaborações enviadas à Revista Higiene Alimentar na forma de artigos, pesquisas, comentários, revisões bibliográficas, notícias e informações de interesse para toda a área de alimentos, devem ser elaboradas utilizando *softwares* padrão IBM/PC (textos em *Word nas mais variadas versões do programa*; gráficos em *Winword, Power Point ou Excel*) ou *Page Maker 7*, ilustrações em *Corel Draw nas mais variadas versões do programa* (verificando para que todas as letras sejam convertidas para curvas) ou *Photo Shop*.

02. Os trabalhos devem ser digitados em caixa alta e baixa (letras maiúsculas e minúsculas), evitando títulos e/ou intertítulos totalmente em letras maiúsculas e em negrito. Tipo da fonte *Times New Roman*, ou similar, no tamanho 12.

03. Do trabalho deverão constar as seguintes partes: Título, Resumo, Palavras-chave, *Abstract*, keywords, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas. Os gráficos, tabelas e figuras devem fazer parte do corpo do texto e o tamanho total do trabalho deve ficar entre 6 e 9 laudas (aproximadamente 9 páginas em fonte TNR 12, com espaçamento entre linhas 1,5 e margens superior e esquerda 3 cm, inferior e direita 2 cm).

04. Resultados de pesquisas relacionados a seres humanos deverão ser apresentados acompanhados do número do parecer junto ao Comitê de Ética da instituição de origem ou outro relacionado ao Conselho Nacional de Saúde.

05. Do trabalho devem constar: o nome completo do autor e co-autores (respeitando o máximo de quatro), e-mail de todos (será publicado apenas o e-mail do primeiro autor, o qual responde pelo trabalho) e nome completo das instituições às quais pertencem, com três níveis hierárquicos (Universidade, Faculdade, Departamento), também a cidade, estado e país.

06. As referências bibliográficas devem obedecer às normas técnicas da ABNT-NBR-6023 e as citações conforme NBR 10520 sistema autor-data.

07. Para a garantia da qualidade da impressão, são indispensáveis as fotografias e originais das ilustrações a traço. Imagens digitalizadas deverão ser enviadas mantendo a resolução dos arquivos em, no mínimo, 300 pontos por polegada (300 dpi).

08. Será necessário que os colaboradores mantenham seus programas anti-vírus atualizados

09. Todas as informações são de responsabilidade do primeiro autor com o qual faremos os contatos, através de seu e-mail que será também o canal oficial para correspondência entre autores e leitores.

10. Juntamente com o envio do trabalho deverá ser encaminhada declaração garantindo que o trabalho é inédito e não foi apresentado em outro veículo de comunicação. Na mesma deverá constar que todos os autores estão de acordo com a publicação na Revista.

11. Não será permitida a inclusão ou exclusão de autores e co-autores após o envio do trabalho. Após o envio do trabalho, só será permitido realizar mudanças sugeridas pelo Conselho Editorial.

12. Os trabalhos deverão ser encaminhados exclusivamente *on-line*, ao e-mail [autores@higienealimentar.com.br](mailto:autores@higienealimentar.com.br) .

13. Recebido o trabalho pela Redação, será enviada **declaração de recebimento** ao primeiro autor, no prazo de dez dias úteis; caso isto não ocorra, comunicar-se com a redação através do e-mail [autores@higienealimentar.com.br](mailto:autores@higienealimentar.com.br)

14. As colaborações técnicas serão devidamente analisadas pelo Corpo Editorial da revista e, se aprovadas, será enviada ao primeiro autor declaração de aceite, via e-

*mail.*

15. As matérias serão publicadas conforme ordem cronológica de chegada à Redação. Os autores serão comunicados sobre eventuais sugestões e recomendações oferecidas pelos consultores.

16. Para a Redação viabilizar o processo de edição dos trabalhos, o Conselho Editorial solicita, a título de colaboração e como condição vital para manutenção econômica da publicação, que pelo menos um dos autores dos trabalhos enviados seja assinante da Revista. Neste caso, por ocasião da publicação, será cobrada uma taxa de R\$ 50,00 por página diagramada. Não havendo autor assinante, a taxa de publicação será de R\$ 70,00 por página diagramada.

17. Quaisquer dúvidas deverão ser imediatamente comunicadas à Redação através do *e-mail*

[autores@higienealimentar.com.br](mailto:autores@higienealimentar.com.br)