

PESQUISA DE INDICADORES HIGIÊNICO-SANITÁRIOS BACTERIANOS EM COMIDAS TÍPICAS JAPONESAS

PESQUISA DE BACTÉRIAS EM COMIDAS TÍPICAS JAPONESAS

RESUMO

Os alimentos típico(s) da culinária japonesa são geralmente preparados manualmente, à base de pescado cru, arroz japonês e alga marinha. São considerados produtos altamente perecíveis, não só porque são consumidos *in natura*, mas também pelos aspectos higiênico-sanitários envolvidos na sua preparação e conservação, os quais exigem cuidados e conhecimento de manipulação do mesmo. Objetivou-se pesquisar indicadores higiênico-sanitários bacterianos em sushis e sashimis comercializados em restaurantes especializados localizados na Região Agreste de Pernambuco. As amostras foram coletadas e avaliadas de fevereiro a dezembro de 2016. Realizaram-se as pesquisas de Bactérias Heterotróficas, *Staphylococcus aureus*, *salmonella spp*, Coliformes totais e Coliformes Termotolerantes. As amostras de sushi ou sashimi apresentavam um bom estado organoléptico, com cor, sabor e odor característicos. A maioria das amostras analisadas apresentou quase que a totalidade das bactérias analisadas, revelando um alto índice de contaminação. Conclui-se que a presença de vários microrganismos indicadores de contaminação e patogênicos, encontrados nas amostras, demonstra que o consumo de sushi e sashimi pode representar uma ameaça à saúde dos consumidores.

Palavras chave: contaminação, alimentação, higiene dos alimentos.

RESEARCH OF BACTERIAL HYGIENIC-SANITARY INDICATORS IN TYPICAL JAPANESE FOODS.

ABSTRACT

The typical food of Japanese cuisine are usually prepared manually based on raw fish, Japanese rice and kelp. They are considered highly perishable products, not only because they are consumed *in natura*, but also for the hygienic-sanitary aspects involved in their preparation and conservation, which require care and knowledge about manipulation of the same. The objective was to search indicators of bacterial hygienic-sanitary in sushis and sashimis marketed in specialized restaurants in the countryside region of Pernambuco. The samples were collected and evaluated from February to December 2016. It was performed the research of Heterotrophic Bacteria, *Staphylococcus aureus*, *salmonela spp*, Total Coliforms and Thermotolerant Coliforms. The samples of sushi or sashimi presented a good organoleptic state, with characteristic color, flavor and odor. Most of the analyzed samples presented almost all the analyzed bacteria, revealing a high contamination index. It is concluded that the presence of several microorganisms indicators of contamination and pathogenic, found in the samples, demonstrates that the consumption of sushi and sashimi can pose a threat to the health of consumers.

Key words: contamination, food, food hygiene.

INTRODUÇÃO

O sushi é um alimento típico da culinária japonesa, preparado manualmente, à base de pescado cru, arroz japonês e alga marinha. Este prato tornou-se popular em outros países além do Japão¹. Por serem pratos preparados com pescado cru são considerados produtos altamente perecíveis, não só porque são consumidos *in natura*, apenas ligeiramente resfriados, mas também pelos aspectos higiênico-sanitários envolvidos na sua preparação e conservação, os quais exigem cuidados e conhecimento de manipulação dos mesmos².

Atualmente há um processo de globalização cada vez mais intenso dos costumes e hábitos alimentares. Prova disso foi a rápida difusão dos alimentos oriundos de países orientais¹. Hoje, existe uma grande procura por estabelecimentos especializados em culinária japonesa, principalmente em pratos à base de pescados crus, como sashimi (que são pedaços finos de filé de peixe servidos crus) e o sushi (sashimi moldado sobre arroz avinagrado)³.

O pescado apresenta excelente composição em aminoácidos, vitaminas e minerais, no entanto este alimento possui propriedades que o torna mais perecível e susceptível à deterioração⁴. Porém, a ocorrência de inadequações como manejo incorreto, falta de treinamento de funcionários, programas de nutrição inadequados, instalações mal projetadas e aproveitadas, afetam diretamente as condições sanitárias da criação dos peixes, prejudicando a qualidade microbiológica da água, atingindo esses animais e afetando a saúde do consumidor destes produtos, considerando que agentes patogênicos podem vir a ser veiculados durante as diversas etapas da produção⁵.

As doenças de origem alimentar são na maioria ocasionadas por microrganismos ingeridos com alimentos contaminados. Considerando que o sushi é o prato tradicional Japonês mais conhecido no mundo, justifica-se a necessidade do estudo dos perigos inerentes a este consumo de alimentos⁶.

Dentre as patogenias que podem ser transmitidas por esses pratos exóticos estão as salmoneloses provocadas pelas bactérias do gênero *Salmonella*, consideradas os principais agentes etiológicos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no mundo². A *Salmonella spp* é um dos principais agentes envolvidos nos surtos de toxinfecções alimentares sendo que, a maior parte destes,

está associada ao consumo de alimentos de origem animal. Devido a elevada endemicidade, alta morbidade e, sobretudo, pela dificuldade no controle, ocasiona maior número de óbitos quando comparada a outros microrganismos⁷.

A presença de *Salmonella spp* e Coliformes nos alimentos é de grande importância para a indicação de contaminação fecal durante o processo de fabricação ou mesmo pós-processamento. Tal grupo de microrganismos pode indicar também provável presença de patógenos, além de poder indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento, evidenciando práticas de higiene e sanificação aquém dos padrões requeridos para o processamento de alimentos⁸.

O “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” define o grupo coliforme como “todas as bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, gram negativas, não esporuladas e na forma de bastonete, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C”. O grupo é formado por cerca de 20 espécies originárias do trato intestinal de humanos e animais de sangue quente. Dentre essas espécies destacam-se *Escherichia*, *Acetobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*.

A presença do *Staphylococcus aureus*, encontrado nas mucosas e superfície da pele humana, é um indicador higiênico-sanitário relacionado à manipulação inadequada. Tal bactéria encontra no pescado um ambiente favorável para sua multiplicação⁹. Algumas cepas de *Staphylococcus aureus* produzem uma enterotoxina termoestável, responsável, no homem, pelos quadros de intoxicação alimentar¹.

A avaliação de indicadores higiênico-sanitários bacterianos, como os coliformes, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella spp*, pode evidenciar riscos aos consumidores que ingerem esse tipo de alimento, velados pela fachada ou bom atendimento do estabelecimento¹⁰.

O presente trabalho tem como objetivo pesquisar indicadores higiênico-sanitários bacterianos em sushis e sashimis comercializados em restaurantes especializados em comidas típicas japonesas, de acordo com o tipo de serviço prestado ao consumidor, sendo eles: *self service*, *a la carte* e *delivery* localizados na Região Agreste de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODO

O estudo foi do tipo laboratorial (experimental), a escolha da amostra foi por conveniência. O trabalho foi realizado de fevereiro a dezembro de 2016.

As amostras foram selecionadas e coletadas de acordo com o plano de amostragem descrito no Codex Alimentarius¹¹, coletando peças de sushi ou sashimi que apresentassem um bom estado organoléptico, com cor, sabor e odor característicos e que fossem comercializados em restaurantes especializados em comida oriental de grande movimentação localizados em cidades do agreste pernambucano. Trata-se de uma amostra de conveniência recolhida como consumidor.

O transporte das amostras foi feito em sacos estéreis apropriados (19 x 30 cm) acondicionados em recipientes isotérmicos até o laboratório de Tecnologia de Alimentos da Faculdade Asces/UNITA e analisados no tempo máximo de 12 horas.

Foram realizadas as análises microbiológicas de Bactérias Heterotróficas, *Staphylococcus aureus*, *salmonella*, Coliformes totais e Coliformes Termotolerantes. Os parâmetros de qualidade das amostras foram analisados de acordo com a Resolução-RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Codex Alimentarius¹¹.

PROCESSAMENTO

O sushi, por ser uma amostra sólida, cujos constituintes diferem em textura, densidade e tamanho de partículas, foi moído e misturado, em condições assépticas de acordo com plano de amostragem preconizado no Codex Alimentarius¹¹. Com o auxílio de luvas de procedimento, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis devidamente fechados e etiquetados (tipo de análise, procedência, data e hora da coleta) e preservadas em caixa isotérmica contendo sacos plásticos com gelo, à temperatura de 4°C.

Alíquotas de 25 g da amostra do alimento foram assepticamente pesadas em sacos plásticos estéreis e homogeneizadas por 2 minutos com 225 mL de água peptonada estéril a 0,1% obtendo diluição 1:10, obtendo-se uma solução mãe.

PESQUISA DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES

Foram utilizados 15 tubos de ensaios contendo tubos de Durham invertidos e caldo lactosado (CL), divididos em 5 tubos com concentração dupla (CLD) e 10 com concentração simples (CLS). Os tubos de CLD receberam 10 mL da amostra, que foram transferidas com uma pipeta estéril. Os tubos contendo CLS foram divididos em cinco que receberam 1 mL de amostra e outros cinco tubos restantes receberam 0,1 mL. Os tubos foram incubados de 24h a 48h a 37°C¹².

A positividade do teste foi indicada pela captação de gás pelos tubos de Durham. Inoculou-se 2 alçadas dos tubos positivo no teste confirmatório em caldo lactosado verde brilhante bile de boi (CLVBB) a 2%, também com tubos de Durham invertidos. Novamente colocados em estufa a 37°C durante 24h a 48h. Assim como na etapa anterior, a positividade de teste foi indicada pela captação de gás nos tubos de Durham¹².

A pesquisa de coliformes termotolerantes foi realizada nas amostras positivas para coliformes totais transferindo-se duas alçadas dos tubos positivos CLVBB para o caldo EC, incubando-se em banho-maria a 44.5°C por 24h¹².

PESQUISA DE *Salmonella spp*

A pesquisa de *Salmonella spp* foi feita utilizando o Agar Hicrome *Salmonella*, onde adicionou-se uma alíquota de 1mL da diluição da amostra em três placas já contendo o Agar, onde dispôs-se as placas incubadas em estufa bacteriológica por 24h a 37°C.

ISOLAMENTO DO *Staphylococcus aureus*

Com auxílio de uma alça bacteriológica calibrada, foi transferido um volume equivalente a 1mL da solução mãe em três placas contendo o meio Ágar Baird-Parker e incubadas na estufa por 24h. O Baird-Parker contém carbono e nitrogênio necessários ao seu crescimento. Os agentes seletivos são glicina, cloreto de lítio e telurite de potássio. Possui ainda gema de ovo, que serve de substrato para a detecção de atividade lipolítica¹³.

A contagem foi realizada utilizando-se um visualizador de colônias, que consiste em uma lente de aumento com iluminação própria¹⁴.

CONTAGEM DE BACTERIAS HETEROTROFICAS

A partir da solução mãe fez-se uma diluição seriada para obter a concentração de 10^{-3} , Dessa diluição, foram retirados 1,0 ml e transferidos para um tubo de ensaio com solução salina peptonada com 9,0 ml, daí formou-se a primeira diluição (10^{-1}). Após essa diluição foram retirados 1,0 ml e transferidos para outro tubo de ensaio com solução salina peptonada com 9,0 ml, e formou-se a segunda diluição (10^{-2}). Por fim, foram retirados 1,0 ml e transferidos para outro tubo de ensaio com solução salina peptonada com 9,0 ml, e formou-se a terceira diluição (10^{-3}).

As amostras foram semeadas em triplicata no meio de cultura Plate Count Agar (PCA), sendo utilizados 1,0 mL e 0,1 mL das amostras para a semeadura pelo método de "Pour Plate". Após este procedimento as placas foram incubadas em estufa bacteriológica, por 18/24h a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Para a metodologia de "Pour Plate" o meio de cultura PCA será mantido em banho-maria a $44-46^{\circ}\text{C}$, para impedir sua solidificação, e posteriormente vertido sobre as amostras, onde foi homogeneizado através de movimentos circulares suaves da placa, no sentido horário. Após o período de incubação, as colônias foram contadas, e o resultado da metodologia expresso em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL)¹⁵.

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados foram digitados, devidamente conferidos e processados no programa Excel 2010 (Microsoft Office®), no qual aplicou-se uma análise descritiva para obtenção de percentual de positividade das amostras, onde foram calculadas a média, desvio padrão e coeficiente de variação.

Os dados alcançados foram armazenados em um banco de dados utilizando-se o aplicativo Excel 2007 (Microsoft Office), sendo expressos por meio dos valores encontrados de Número Mais Provável (NMP) do microrganismo de interesse por grama de alimento (NMP/g), obtidos através da Tabela de Hoskins. Para classificação do grau de contaminação, criou-se um índice, desenvolvido neste estudo, estratificando o resultado em 5 partes, de acordo com a Tabela 1, tendo como base as faixas de NMP/g, com a finalidade de se estabelecer o índice de contaminação das amostras pelo grupo Coliformes.

Tabela 1. Índice de contaminação microbiana expressos em NMP/g.

Índice de contaminação	Classificação	NMP/g
0	Negativo	<2
1,0	Baixo	2 a 9
1,1	Intermediário	11 a 90
1,4	Alto	110 a 900
1,7	Muito Alto	1600 ou >1600

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados 15 estabelecimentos, nos quais foram obtidas amostras que foram classificadas de três formas, de acordo com o tipo de serviço prestado ao consumidor, sendo elas: *self-service* (E1 a E4), *a la carte* (E5 a E13) e *delivery* (E14 e E15).

Para coliformes termotolerantes, segundo a Tabela 2, 50% das amostras do tipo *Self-Service* apresentaram nível de contaminação alto, enquanto que os outros 50% apresentaram nível de contaminação muito alto. Quanto ao serviço *a la carte*, 66,6% das amostras não apresentaram contaminação e 33,4 % apresentaram nível de contaminação muito alto. Já no serviço de *delivery*, 50% das amostras apresentaram nível de contaminação intermediário, enquanto que o restante das amostras se enquadrou num nível elevado de contaminação.

Tabela 2. Percentual dos índices de contaminação por coliformes totais e termotolerantes em sushis e sashimis comercializadas em restaurantes especializados em comida oriental.

Tipos de Estabelecimento	Amostras	Índice de Contaminação	
		CT*	CTT**
Self-Service	E1	Muito Alto	Muito Alto
	E2	Muito Alto	Alto
	E3	Muito Alto	Alto
	E4	Muito Alto	Muito Alto
A la Carte	E5	Muito Alto	Negativo
	E6	Muito Alto	Negativo
	E7	Muito Alto	Negativo
	E8	Muito Alto	Muito Alto
	E9	Muito Alto	Negativo
	E10	Muito Alto	Negativo
	E11	Muito Alto	Negativo
	E12	Muito Alto	Muito Alto
	E13	Muito Alto	Muito Alto
Delivery	E14	Muito Alto	Muito Alto

E15

Muito Alto

Negativo

Intermediário

Muito Alto

*CT= Coliformes Totais

**CTT= Coliformes Termotolerantes

De acordo com a RDC n. 12/01 do Ministério da Saúde¹⁶, das 15 amostras analisadas, 53,3% apresentaram contagem de coliformes termotolerantes acima do limite permitido pela legislação brasileira (10^2 NMP/g). Resultados obtidos por Pereira e colaboradores (2008) identificaram a presença de coliformes termotolerantes em 90% das 30 amostras de sushi analisadas indicando condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, assim como a possível presença de outros patógenos potenciais e oportunistas¹⁷.

Tabela 3. Nível de contaminação por bactérias heterotróficas em sushis e sashimis comercializados em restaurantes especializados em comida oriental.

Nível de contaminação	Grupo1	Grupo2	Grupo3
	E1 ($4,75 \times 10^4$)	E5 ($1,79 \times 10^5$)	E3 (incontáveis)
	E2 ($9,0 \times 10^4$)	E6 ($1,52 \times 10^5$)	E11 ($1,78 \times 10^6$)
	E4 ($9,46 \times 10^4$)	E7 ($1,15 \times 10^5$)	E12 ($1,98 \times 10^6$)
	E8 ($4,36 \times 10^4$)	E10 ($2,81 \times 10^5$)	
	E9 ($4,67 \times 10^4$)	E15 ($3,06 \times 10^5$)	
	E13 ($7,6 \times 10^4$)		
	E14 ($2,8 \times 10^4$)		

Através da tabulação de dados, a contagem de bactérias heterotróficas foi dividida em três grupos baseados em seus níveis de contaminação, como é demonstrado na Tabela 3, sendo grupo 1 (0 a 99 UFC/g), grupo 2 (100 a 999 UFC/g) e o grupo 3 (1000 até 9999 UFC/g). No serviço de *self service* 75% das amostras apresentaram nível de contaminação 1. *A la carte* 44,4% das amostras apresentaram nível de contaminação 2. Já no *Delivery* 50% das amostras apresentaram nível de contaminação 2.

Através desses resultados pode-se ver que os estabelecimentos de serviços Delivery foram os mais contaminados, seguido dos *a la carte* e em terceiro os *self service*, com relação a contagem de bactérias heterotróficas. Essa contaminação está atrelada a contaminação cruzada, má higienização das mãos dos manipuladores e/ou dos equipamentos e utensílios utilizados. Apesar de ser considerado pelo Codex Alimentarius¹¹ como um indicador geral de contaminação, a resolução nacional vigente não preconiza sobre bactérias heterotróficas, logo não possuindo um padrão comparativo para reprovação das amostras.

Quanto a *salmonella spp*, 75% das amostras *self service* apresentaram crescimento incontável, sendo essa mesma condição vista em 88,8% das amostras *a la carte* e em 100% das amostras *Delivery*.

Das 15 amostras selecionadas pelos critérios de elegibilidade desse trabalho, 80% estariam impróprias para consumo segundo a RDC n. 12/01 do Ministério da Saúde. Realizando um comparativo entre coliformes e salmonella observa-se a necessidade da pesquisa de coliformes totais, pois a não presença de termotolerantes não é indicativo de ausência de salmonella, sendo notória a falha da resolução vigente que não preconiza sobre os coliformes totais.

Acredita-se que a presença de *salmonella spp* em pescados seja oriunda de contaminação durante o processamento e manipulação¹⁷. Estudos realizados com peixes demonstraram que o microrganismo do gênero salmonella não foi identificado na microbiota desses animais¹⁸.

A ausência do *Staphylococcus aureus* foi obtida em 25% amostras Self service, 55,5% das amostras *a la carte* e 50% das amostras Delivery. Bactérias deste gênero fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas de seres humanos e é um indicativo de contaminação do alimento durante a manipulação, principalmente quando não se utilizam equipamentos de proteção¹.

CONCLUSÃO

A presença de vários microrganismos indicadores de contaminação e patogênicos encontrados nas amostras demonstra que o consumo de sushi e sashimi pode oferecer ameaça à saúde dos consumidores, independente do tipo de serviço prestado (*self service, a la carte e delivery*).

Aconselha-se aos profissionais responsáveis pela manipulação e distribuição de produtos à base de pescado cru, medidas higiênico-sanitárias mais rigorosas através da adoção e aplicação das Boas Práticas de Fabricação (BPF), com intuito de controlar os possíveis riscos potenciais à saúde do consumidor. Como também recomenda-se uma maior atenção por parte das autoridades sanitárias para com estabelecimentos que comercializem pratos à base de peixe cru. Os consumidores também devem ser esclarecidos sobre os riscos aos quais estão resignados ao consumir esse tipo de alimento¹.

REFERÊNCIAS

1. Santos AA, Simões GTN, Cruz MM, Ferreira NSS, Lima RTC, Tunon GIL. Avaliação da qualidade microbiológica de *sushi* comercializado em restaurantes de Aracaju, Sergipe. 2012
2. Menezes FGR, Silva CM, Carvalho FCT, Sousa DBR, Vieira, RHSF. *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva em *sushis* e *sashimis* comercializados na cidade de Fortaleza, Ceará. 2006.
3. Lima RMT, Shinohara NKS, Siqueira LP, Lima RCT, Pires EF, Ximenes GNC, Barbosa VB. Avaliação microbiológica de *sushis* e *sashimis* comercializados na cidade do Recife-PE. Recife 2007.
4. Rodrigues BL, Santos LR, Mársico ET, Camarinha CC, Mano SB, Conte Jr CA. Qualidade físico-química do pescado utilizado na elaboração de *sushis* e *sashimis* de atum e salmão comercializados no município do Rio de Janeiro, Brasil. Recife 2012.
5. Lorenzon CS. Perfil microbiológico de peixes e água de cultivo em pesque-pagues situados na região nordeste do estado de São Paulo. São Paulo, 2009.
6. Patrocinio IDR. A segurança alimentar no consumo de pescado cru com valência para a produção de *sushi*. Lisboa. 2009.
7. Cardoso TG. Toxinfecção alimentar por *Salmonella spp.* Revista Inst. Ciênc. Saúde. 2006.
8. Geus JAM, Lima IA. Análise de coliformes totais e fecais: um comparativo entre técnicas oficiais VRBA e Petrifilm EC aplicados em uma indústria de carnes. Paraná, 2007.
9. Sales LM, Silva TM. *Staphylococcus aureus* metilina resistente: um desafio para a saúde pública. Acta Biomedica Brasiliensia 3.1 (2012): 1-13.
10. Basti AA, Misaghi A, Kamkar AAF, Salehi MTZ. Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted iranian fish. Food control 17.3 (2006): 183-188.
11. Jay JM. Microbiologia de Alimentos, 6ª ed. Artmed, Porto Alegre-RS, 2005.
12. Momesso AP, Matté MH, Germano PML. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de restaurantes tipo self-service, por quilo do município de São Paulo, durante o período de distribuição de refeições. Hig.Aliment, 19 (136), 81-89, 2005.

13. Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW. Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. American Society for Microbiology. 2011.
14. Silva MA. Utilização de PCR multiplex para o diagnóstico etiológico da mastite bovina. 35f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 2008.
15. Eaton AD, Clesceri LS, Rice EW, Greenberg AE. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21.ed. Maryland: APHA; 2005.
16. Neto GV. Resolução-RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. 1998.
17. Pereira, WD. Avaliação microbiológica de sushis e sashimis comercializados na cidade de Maceió-AL. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Alagoas, Faculdade de Nutrição. Maceió 2008. 99p.
18. Kumar HS, Sunil R, Venugopal MN, Karunasagar I, Karunasagar I. Detection of *Salmonella spp.* in tropical seafood by polymerase chain reaction. International journal of food microbiology 88.1 (2003): 91-95.