

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Avaliação Microbiológica de *Sashimi*
Microbiota deteriorativa e patogénica**

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar

Cátia Isabel Calado dos Santos

Orientadora: Professora Doutora Alexandra Esteves

Coorientadora: Professora Doutora Cristina Saraiva



VILA REAL, 2013

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Avaliação Microbiológica de *Sashimi*
Microbiota deteriorativa e patogénica**

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar

Cátia Isabel Calado dos Santos

Orientadora: Professora Doutora Alexandra Esteves

Coorientadora: Professora Doutora Cristina Saraiva

Composição do Júri:

Presidente:

VILA REAL, 2013

Agradecimentos

A realização deste projeto não seria possível sem a amizade, o apoio e a colaboração de pessoas que ficarão para sempre na minha memória e no meu coração.

À minha orientadora, Professora Doutora Alexandra Esteves, pela boa disposição, compreensão e apoio ao longo desta viagem, pelo profissionalismo com que sempre me presenteou, pela colaboração e tempo disponibilizado na transmissão de conhecimentos e ideias, pela paciência e amizade demonstrada para comigo.

À minha coorientadora, Professora Doutora Cristina Saraiva pela orientação, disponibilidade e profissionalismo ao longo desta caminhada, pela amizade e compreensão demonstrada para comigo.

À Professora Irene Oliveira, pelo suporte disponibilizado, ajuda e profissionalismo.

À Dona Ana Leite, Senhor Felisberto Borges e à Dona Fátima pela amizade, dedicação, colaboração e empenho demonstrados durante todo o tempo sendo essencial para a materialização deste trabalho.

À minha mãe Natália e ao meu pai José por me levarem tantas vezes ao colo quando eu não conseguia mais avançar, por sofrerem junto comigo, por todo o orgulho que sempre demonstraram em cada etapa vencida e amor, à minha irmã Inês que é o meu orgulho, por me fazer rir. Sem eles, sem a sua ajuda os momentos difíceis teriam sido muito mais custosos de ultrapassar.

Às amigas que fiz nestes dois anos em Vila Real, em especial à Célia Pimenta, à Marisa Pereira, à Joana Pires, à Helena Vasconcelos e à Marlene Pinto pelos momentos de riso e de choro de tanto rir, por estarem presentes nos momentos difíceis, pelas aventuras, pela dedicação e principalmente pela amizade. Ao José Pinto, Joana Pereira e Leandro Costa pelos momentos divertidos e companheirismo.

Resumo

Em Portugal, nos últimos anos têm aumentado o número de restaurantes tradicionais japoneses. Estes restaurantes podem revelar algumas questões de segurança alimentar caso os planos de HACCP não sejam bem delineados e as boas práticas de higiene não sejam devidamente implementadas e executadas.

O pescado fresco é muito susceptível a deterioração. O objectivo deste estudo consistiu em conhecer a microbiota deteriorativa e patogénica e algumas características físico-químicas das refeições de *Sashimi* servidas em diversos restaurantes no Norte de Portugal, avaliando a sua qualidade e segurança sanitária para o consumidor.

Neste estudo foi realizada a recolha de 61 refeições de *Sashimi* em 23 restaurantes tradicionais japoneses do Norte do país. Foram efetuadas as determinações microbiológicas de microrganismos mesófilos e psicotróficos, *Enterobacteriaceae*, Bactérias do ácido láctico, *Pseudomonas* spp., *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, Coliformes totais, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Clostridium* spp., *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Vibrio* spp. e Bolores e físico-químicas (pH e ABVT). Os índices químicos revelaram um bom grau de frescura do pescado utilizado na preparação das refeições de *Sashimi*. Contudo, de acordo com os resultados microbiológicos 64% das 61 refeições analisadas foram classificadas como insatisfatórias. Contribuíram para esta situação, os teores de *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, Bolores, Mesófilos, *Bacillus cereus* e Leveduras. Numa amostra detetou-se presença de *Listeria* spp., não se tendo contudo detetado *Listeria monocytogenes*. Os resultados obtidos com este trabalho são indicativos de falhas de higiene na preparação das refeições de *Sashimi*.

Neste trabalho foram ainda realizados inquéritos aos responsáveis de 23 restaurantes em estudo, dos quais apenas 16 se mostraram disponíveis para responder. Das várias questões efetuadas, destacamos a referência às vantagens na utilização de pescado fresco, cujos inquiridos referiram preferir a sua utilização em detrimento do pescado congelado, pois consideram que o pescado fresco apresenta um melhor sabor, qualidade, textura e cor. Ao nível do sistema de HACCP consideram que o ponto de Controlo Crítico é a refrigeração com 47% das respostas, tendo-se concluído que 35% dos inquiridos não sabem qual é o PCC e, em alguns casos, até nem o que é o plano de HACCP. Este facto revela a necessidade de

implementação e melhoria nos sistemas de autocontrolo neste tipo de estabelecimentos de forma a salvaguardar a segurança das refeições de pescado cru para o consumidor.

Palavras-chave: *Sashimi*, Pescado cru, Segurança alimentar, Análises microbiológicas, HACCP.

Abstract

The number of traditional Japanese restaurants has increased greatly in Portugal in recent years. These restaurants not only reveal some food safety issues related to HACCP plans if not well defined but also to improperly implemented and enforced healthy hygienic practices.

Seeing that fresh fish is very likely to decay quickly, the aim of this study was to identify both microbiota and some physicochemical properties in the *Sashimi* meals served at several restaurants in the north of Portugal and assess the health and safety for consumers.

This study examined sixt-one *Sashimi* meals served at twenty-three traditional Japanese restaurants in the north of the country. Microbiological determinations were performed such as physicochemical properties, deteriorative and pathogenic microbes. Chemical indices (pH and TVB-N) revealed a good degree of freshness in the fish used when preparing *Sashimi* meals. However, according to the microbiological results, 64% of the sixty-one meals analyzed were classified as unsatisfactory. *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus Aureus*, *Bacillus Cereus*, mesophilic, moulds and yeasts contributed to this analysis. One sample detected *Listeria* sp. whose results are indicative of hygiene problems in the preparation of *Sashimi* meals.

The study established that only 16 out of the 23 restaurants reviewed were available to respond to this survey. Despite the disadvantages of using fresh fish, restaurant officials prefer its use in detriment to frozen fish since fresh represents better quality in flavour, texture, and colour. The HACCP considers that the critical control point relates to chilling with 47% of responses, thus concluding that 35% of respondents do not know what PCC is and in some cases, they do not know what the HACCP plan is.

Keywords: *Sashimi*, raw fish, food security, microbiological analysis, HACCP

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	II
Abstract	III
Lista de abreviaturas.....	VIII
Índice de tabelas	IX
Índice de Gráficos	X
Capítulo I.....	1
I.1. Introdução	2
I.2. Valor económico associado ao consumo de peixe em Portugal	3
I.3. Fatores Históricos com interesse no consumo de peixe cru	4
I.4. O atual interesse no consumo de peixe cru em Portugal	7
I.5. Deterioração do Pescado.....	9
I.6. Perigos microbiológicos em Segurança Alimentar no pescado cru.....	12
I.6.1. Caracterização da Microbiota mais frequentemente encontrada no pescado.....	12
I.6.2. Microrganismos no Pescado.....	13
I.6.2.1. Microrganismos mesófilos	13
I.6.2.2. Microrganismos psicotróficos	13
I.6.2.3. <i>Enterobacteriaceae</i>	14
I.6.2.4. Bactérias do ácido láctico	14
I.6.2.5. <i>Clostridium</i> spp.....	14
I.6.2.6. <i>Clostridium perfringens</i>	15
I.6.2.7. Coliformes totais.....	15
I.6.2.8. <i>Pseudomonas</i> spp.	16
I.6.2.9. <i>Shewanella putrefaciens</i>	17
I.6.2.10. <i>Photobacterium phosphoreum</i>	17

I.6.2.11. <i>Bacillus cereus</i>	17
I.6.2.12. <i>Staphylococcus aureus</i>	18
I.6.2.13. <i>Listeria</i> spp.	19
I.6.2.14. <i>Salmonella</i> spp.....	19
I.6.2.15. <i>Escherichia coli</i>	20
I.6.2.16. <i>Vibrio</i> spp.	20
I.6.2.17. Bolores e Leveduras	21
I.6.2.18. Vírus	22
I.6.3. Fatores que influenciam a Microbiota do alimento.....	23
I.6.3.1. Fatores Extrínsecos.....	23
I.6.3.2. Fatores Intrínsecos.....	24
I.6.4. Análise de Perigos e Controlo dos Pontos Críticos (HACCP).....	26
I.6.5. Critérios Microbiológicos aplicáveis aos alimentos.....	26
Capítulo II	29
II.1. Introdução e objectivos.....	30
II.2. Material e métodos	31
II.2.1. Amostragem.....	31
II.2.2. Determinações efetuadas	31
II.2.3. Determinações físico-químicas	32
II.2.3.1. pH e ABVT	32
II.2.4. Determinações microbiológicas.....	33
II.2.4.1. Preparação da amostra.....	33
II.2.5. Microrganismos quantificados	33
II.2.5.1. Microrganismos mesófilos totais e psicotróficos	33
II.2.5.2. <i>Enterobacteriaceae</i>	34
II.2.5.3. Bactérias do Ácido Lático	34

II.2.5.4. <i>Pseudomonas</i> spp.	34
II.2.5.5. <i>Shewanella putrefaciens</i>	35
II.2.5.6. <i>Photobacterium phosphoreum</i>	35
II.2.5.7. Coliformes totais	35
II.2.5.8. Bolores e Leveduras	35
II.2.6. Microrganismos patogénicos quantificados e/ou pesquisados	36
II.2.6.1. Pesquisa e contagem de <i>Clostridium perfringens</i>	36
II.2.6.2. Pesquisa de <i>Clostridium</i> spp.	36
II.2.6.3. Pesquisa e contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	36
II.2.6.4. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	37
II.2.6.5. Pesquisa e contagem de <i>Listeria</i> spp.....	38
II.2.6.6. Isolamento e Contagem de <i>Escherichia coli</i>	39
II.2.6.7. Pesquisa de <i>Bacillus cereus</i>	39
II.2.6.8. Pesquisa e Contagem de <i>Vibrio</i> spp.	40
II.2.7. Inquéritos	40
II.2.8. Análise de dados	41
Capítulo III	42
III. Resultados e discussão	43
III.1. pH e ABVT.....	43
III.2. Avaliação Microbiológica	44
III.2.1. Microbiota deteriorativa.....	46
III.2.2. Microbiota patogénica pesquisada.....	51
III.2.3. Microbiota patogénica quantificada.....	52
III.3. Correlações e significâncias	55
III.4. Avaliação higiénica das refeições de <i>Sashimi</i> de acordo com a espécie de Pescado ..	56
III.5. Avaliação de conhecimentos e práticas de manipuladores de pratos tradicionais japoneses.....	57

III.5.1. Variável Idade e Formação	58
III.5.2. Variável Localidade	60
III.5.3. Variáveis Origem Pescado, Média de Refrigeração e Tábua de Corte	61
III.5.4. Variável Vantagens da Utilização de Pescado Fresco	62
III.5.5. Variável Desvantagens da Utilização de Pescado Fresco	63
III.5.6. Utilização de Vegetais Desinfectados	64
III.5.7. No seu plano HACCP qual considera ser o PCC?	65
IV. Conclusões	67
V. Referências Bibliográficas	70
Anexo I.....	81
Anexo A.1. Meio de Glucose Agar	82
Anexo A.2. Lyngby Iron Agar.....	82
Anexo A.3. VL (s) e VL (2x)	82
Anexo A.4. Solução de Sulfametazina	83
Anexo A.5. Meio de Chapman	83
Anexo A.6.Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MYP).....	84
Anexo A.7. ASPW.....	84
Anexo A.8. TSAT.....	84
Anexo A.9. TSI salino	85
Anexo A.10. NSA.....	85
Anexo A.11. O/F Medium.....	85
Anexo A.12. TSA-YE	86
Anexo B.1 Inquérito	87
Anexo II.....	91

Lista de abreviaturas

ABVT – Azoto Base Volátil Total	MRS – Man Rogosa Sharpe
ADP – Adenina Difosfato	N – Azoto
APT – Água Peptonada Tamponada	Nit 1 - ácido sulfanílico+ácido acético
ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica	Nit2 - N-N-dimetil- α -naftilamina+ácido acético
ATP – Adenina Trifosfato	NP – Norma Portuguesa
a_w – Atividade de água	OMS – Organização Mundial de Saúde
BAL – Bactérias do Ácido Láctico	PCA – Plate Count Agar
BHI – Brain Heart Infusion	PCC – Ponto Crítico de Controlo
BP – Baird Parker	pH – potencial de hidrogénio
BVT – Bases Voláteis Totais	PIB – Produto Interno Bruto
CP – Creatina-fosfato	RVS - Rappaport Vassiliadis Broth with soya
CDC – Center of Disease Control	TBX - Tryptone Bile Glucuronic Agar
CFC – <i>Pseudomonas</i> agar base	TCBS – Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar
CGA – Chloramphenicol Glucose Agar	TMA – Trimetilamina
CO ₂ – Dióxido de Carbono	TSAT – Trypticase soy agar triphenyltetrazolium
d. C. – depois de Cristo	TSA-YE - Trypticase Soy Agar with 0.6% Yeast Extract
DMA – Dimetilamina	TSC – Tryptose Sulfite Cydoserine Agar
DTA – Doenças Transmitidas por Alimentos	TSI – Triple Sugar Iron Agar
Eh – Potencial oxido-redução	UE – União Europeia
FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura	ufc – Unidades Formadoras de Colónias
HACCP - Hazard Analysis Critical Control Points – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo	UVM - University of Vermont Medium
H ₂ S – Sulfureto de Hidrogénio	VAB – Valor Amultiplica-sentado Bruto
i.e. – isto é	VHA – Vírus Hepatite Tipo A
ICMSF – Comissão Internacional sobre as Especificações Microbiológicas dos Alimentos	VRBG – Violet Red Bile Glucose
ISO – International Organization for Standardization	VRBL – Violet Red Bile Lactose
MYP - Manitol Egg Yolk Polimixina Agar	XLD - Xylose Lysine Deoxycholate Agar
MKT - Muller Kauffmann tetrathionate-novobiocin broth	ZEE – Zona Económica Exclusiva
	μ m – micrómetro
	°C – Grau Celsius

Índice de tabelas

Tabela 1: Valores Mínimos, Máximos e Óptimos de pH.....	25
Tabela 2: Norma da Organização Mundial de Saúde para a Qualidade Microbiológica de vários alimentos prontos a comer	28
Tabela 3 : Valores de pH e ABVT (média \pm desvio padrão), de acordo com o tipo de pescado.	43
Tabela 4 : Valores guia para a avaliação microbiológica de amostras de <i>Sashimi</i>	45
Tabela 5 : Valores de Média e Desvio Padrão para a Microbiota Deteriorativa, expressos em log (ufc/g), de acordo com o tipo de Pescado.	46
Tabela 6 : Número de casos, Presença ou Ausência da Microbiota Patogénica para cada tipo de Pescado.	51
Tabela 7 : Valores de Média e de Desvio Padrão para a Microbiota Patogénica de acordo com o tipo de Pescado.	52
Tabela 8 : Correlações de Pearson (r) e valores de Significância para os parâmetros analisados.	55
Tabela 9 : Avaliação higiénica de refeições de Sashimi de acordo com a espécie de pescado.	57
Tabela 10 : Variável Idade e Formação	59
Tabela 11 : Variável Localidade	60
Tabela 12: Variáveis Origem, Refrigeração e Tábua de Corte	61
Tabela 13: Microbiota presente em 61 amostras de <i>Sashimi</i>	92

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Vantagens da Utilização de Pescado Fresco	62
Gráfico 2: Desvantagens da Utilização de Pescado Fresco.....	63
Gráfico 3: Utilização de Vegetais Desinfectados.....	64
Gráfico 4: Qual o PCC no Plano de HACCP implementado	65

Capítulo I

Revisão Bibliográfica

I.1. Introdução

Na União Europeia (UE), é obrigatório por lei que todos os operadores das empresas do setor alimentar identifique os riscos alimentares em todas as fases da sua atividade, assegurando a segurança sanitária dos alimentos, garantindo que ações de controlo em todo o processo produtivo são implementadas, mantidas e revistas segundo o Regulamento 852/2004. Independentemente do género alimentício, quase toda a legislação nacional e internacional está direcionada numa perspetiva de avaliar e gerir os riscos dos alimentos para o consumidor.

A análise de riscos no processo de produção e manipulação dos alimentos, deve identificar e caracterizar os perigos no processo, assim como a exposição e caracterização dos riscos (Mitchell, 2000). O HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo), é um sistema de identificação e prevenção de potenciais perigos de segurança alimentar, no processamento, distribuição e uso de alimentos (Baker, 1995). As medidas preventivas adotadas por este sistema são a identificação de Pontos Críticos de Controlo (PCC), onde um potencial perigo associado ao alimento, ao seu armazenamento e ao seu processamento manual e/ou mecânico, pode ser controlado (Baker, 1995).

Os alimentos são heterogéneos, pelo que a deterioração é consequência da multiplicação e/ou atividade microbiana e evolução química. No pescado em particular a multiplicação microbiana leva a alterações sensoriais características (Gram e Huss, 1996).

Os alimentos crus são inicialmente contaminados por uma variedade de microrganismos, designados comumente por microbiota intrínseca, mas só uma parte destes consegue colonizar o alimento e multiplicar-se em elevado número (Gram e Huss, 1996). No caso do pescado aplica-se o mesmo princípio, em que uma fração da microbiota é responsável pelo processo de deterioração, sendo dependente de fatores intrínsecos ou extrínsecos (Koutsoumanis *et al.*, 1999), nomeadamente a temperatura, pH, atividade da água (a_w), potencial redox (Eh), interações microbianas, entre outros fatores (Gram e Huss, 1996). Pequenas alterações, que podem ocorrer no processamento ou embalagem dos produtos da pesca, são causadores de alterações drásticas no desenvolvimento e composição da microbiota deteriorativa, condicionando assim diferentes tipos de degradação nos alimentos (Gram e Huss, 1996).

A microbiota deteriorativa, responsável pela degradação do pescado (quando armazenados sob condições de aerobiose e temperatura de refrigeração, aproximadamente 4°C), são na sua maioria organismos psicotróficos (Ferreira Canas *et al.*, 2010).

Quando um sistema aquático está contaminado com bactérias patogénicas, estas bactérias posteriormente podem fazer parte da microbiota do pescado. Se associado a esta contaminação prévia, houver um inapropriado processo de embalagem, carregamento e preservação do produto então as bactérias patogénicas proliferam exponencialmente de uma forma perigosa, aumentando o risco de doença de origem alimentar pelo consumo desses alimentos contaminados (Colakoglu *et al.*, 2006).

Para além deste facto, a falta de boas práticas de higiene no processo produtivo, podem resultar na contaminação de bactérias patogénicas causadoras de doenças (ICMSF, 1998). A qualidade do peixe fresco é a principal preocupação da indústria e dos consumidores (Chytiri *et al.*, 2004). Assim sendo, torna-se necessário garantir a qualidade e a segurança das suas características microbiológicas, bioquímicas e organolépticas, em conformidade com as normas de qualidade microbiológica dos alimentos prontos a consumir (Gilbert *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2005). Refiram-se os padrões bacteriológicos de alimentos portugueses (Ribeiro, 1974) e os regulamentos e decretos estabelecidos pela legislação portuguesa e comunitária (Regulamento 2073 de 2005 e Regulamento 1414 de 2007).

I.2. Valor económico associado ao consumo de peixe em Portugal

A pesca é uma importante atividade económica que, em Portugal, ao contrário de alguns países (Islândia e Noruega) tem um peso reduzido no Produto Interno Bruto (PIB) e no Valor Acrescentado Bruto (VAB) do país. Em Portugal, os valores destes indicadores económicos situam-se abaixo de 1%. O Valor Acrescentado Bruto do setor (VAB Pescas) representou, em 2005, cerca de 0,29% do VAB Nacional. A quebra de importância do setor na economia nacional deve-se, em grande parte, à tendência de multiplicação dos preços de venda registados desde o ano de 2002. Assim, não é através destes indicadores económicos que se poderá medir a importância efetiva desta atividade. As novas tendências do setor evidenciam a redução das oportunidades da pesca e, conseqüentemente, das capturas. Deste modo os governantes e os profissionais do setor, discutem a necessidade de uma gestão dos recursos e do meio marinho mais eficaz, equilibrada e sustentada. Assim sendo, estamos

perante um enorme desafio, de forma, a garantir a sustentabilidade dos recursos, fomentar a competitividade do setor e assegurar a sustentabilidade económica e social das comunidades piscatórias (INE, 2008).

O emprego direto no setor (pesca/captura, aquicultura e indústria transformadora dos produtos da pesca) representa 0,6% numa população ativa de cerca de cinco milhões e meio de pessoas. Portugal destaca-se, no quadro da União Europeia, pela sua localização periférica e pela sua vasta Zona Económica (INE, 2008).

A localização, que resulta de uma extensa linha de costa continental e da natureza dos arquipélagos das Regiões Autónomas dos Açores e da Madeira torna Portugal num país com uma Zona Económica Exclusiva (ZEE) de 1656 mil km² e uma costa continental com cerca de 942 km, a pesca constitui assim uma importante fonte de subsistência das populações litorais (INE, 2008).

É por isso importante salientar que o consumo *per capita* dos produtos da pesca em Portugal no ano de 2003 era de 33,5kg/pessoa/ano, dividindo-se em, peixe (fresco, refrigerado, congelado ou em conserva) 22,5kg/pessoa/ano, bacalhau e outros peixes secos, salgados, fumados ou em salmoura 5,5kg/pessoa/ano e crustáceos e moluscos (frescos, refrigerados, congelados ou em salmoura) 5,9kg/pessoa/ano (Veiga *et al.*, 2008). Os portugueses são, assim, os maiores consumidores de pescado no seio da União Europeia.

I.3. Fatores Históricos com interesse no consumo de peixe cru

Ninguém sabe ao certo quando surgiu o *Sushi*, se bem que no século V a.C. já se fizessem conservas de peixe com arroz no Sudeste da Ásia (Barber e Takemura, 2008). O *Sushi* apareceu há séculos como um modo de conservação do peixe. Era um método proveniente dos países asiáticos que consistia na prensagem de peixe com sal, em que este fermentava durante alguns meses antes de ser consumido. Alguns restaurantes em Tóquio ainda servem esse *Sushi* original, chamado *NareSushi*, feito com carpa de água-doce. O seu sabor é tão forte que acaba por encobrir totalmente o sabor do peixe (Barber e Takemura, 2008).

A história do *Sushi* remonta à necessidade de conservação de peixe cru, através de técnicas desenvolvidas no Sudeste Asiático e China. A cabeça e as vísceras eram retiradas, os filetes do peixe cru eram salgados e acondicionados num barril de madeira com camadas de arroz

cozido entre eles. Com a fermentação natural do arroz, ocorria a libertação de ácido láctico, o que provocava a diminuição do pH do peixe e garantia a sua conservação. O longo processo de armazenamento entre um e três anos do arroz tornava-o impróprio para consumo e apenas o peixe era aproveitado (Barber e Takemura, 2008).

Ao ser introduzido no Japão, no início século VIII d.C., a técnica sofreu uma pequena modificação, teve início a utilização de pedras para prensar o peixe cru e o arroz. Deste modo, foi assim criado um tipo de *Sushi*, o *NareSushi*, que tinha o odor e sabor fortes como características dominantes. Um exemplo actual desse tipo de *Sushi* é o *FunaSushi*, feito com a carpa (Yoshino, 1997).

No século XV, um tipo de *Sushi* chamada *NamanareSushi* foi então desenvolvido. Basicamente, tratava-se do *NareSushi* com um período de fermentação menor, cerca de um mês, o que já permitia o consumo do arroz e do peixe juntos. É considerada a primeira forma do *Sushi* moderno (Yoshino, 1997).

A introdução do vinagre na preparação do arroz para *Sushi* ocorreu no século XVII, em Edo, actual Tóquio, pelo médico Matsumoto Yoshiichi. Isto possibilitou a redução do tempo de preparação do *Sushi* para um dia. Com a abundância de pescado e de frutos do mar na baía de Tóquio, o peixe passou a ser consumido cru e fresco. Além do ganho em tempo de preparação do *Sushi*, o vinagre adicionou um sabor especial ao prato. Este tipo de *Sushi* é chamado de *HayaSushi* (Yoshino, 1997).

Ainda no final do século XVII, um novo tipo de *Sushi* viria a ser criado na região de Osaka: *ooshiSushi*. Numa caixa de madeira, o arroz de *Sushi* e o peixe cru são colocados com um peso por cima para induzir a respectiva compressão. O *Sushi* é cortado em pedaços retangulares. O estilo de *Sushi* de Osaka ficou conhecido como estilo Kansai (Yoshino, 1997).

No entanto, no início do século XIX surge aquele que é considerado o primeiro *Sushi* da história, através de um hábil chefe chamado Hanaya Yohei (1799-1858), que resolveu confeccionar um *Sushi* que deixasse de ser apenas um método de preservação, e acabou por desenvolver um *Sushi* parecido com o que actualmente se consome. Ele criou o tipo de *Sushi* mais popular, o *Niguirisushi*. Um bolinho de arroz de *Sushi* com uma fatia de peixe cru por cima, para consumo imediato, que podia ser manuseado com as mãos, dispensando os *hashis* (“pauzinhos”). Como não havia frigoríficos, os peixes eram marinados em molho de soja ou

vinagre e o tamanho era aproximadamente o dobro dos atuais (Barber e Takemura, 2008). Era servido em *yattai* (barracas) nas ruas de Tóquio. Ele trazia o peixe para a sua *yattai* em caixas com gelo e os clientes podiam escolher o prato do dia.

Na verdade esta barraca era um tipo de carroça com um balcão e uma cortina. Até ao começo deste século, os *yattais* mais populares eram aqueles que tinham as cortinas mais sujas. A cortina suja significava que a barraca tinha bastante movimento e portanto era boa. Os clientes comiam o *Sushi*, mergulhavam os seus dedos em chás e enxugavam as mãos na cortina (Barber e Takemura, 2008).

O prato, rapidamente se tornou muito popular no Japão em duas modalidades: o Kansai, da cidade de Osaka, na região de Kansai; e o Edo, de Tóquio. Osaka sempre foi a capital comercial do Japão, e os seus comerciantes de arroz desenvolveram um *Sushi* que consistia em arroz temperado misturado com outros ingredientes, servido numa embalagem comestível decorada. Tóquio, localizada numa baía rica em peixe e frutos do mar, produzia o *NigiriSushi*, que consistia numa pequena porção de peixe ou frutos do mar sobre um bolinho de arroz temperado (Barber e Takemura, 2008).

Desde a década de 50 os restaurantes de *Sushi* mudaram para um estilo mais ocidental, com instalações fixas e lugares para sentar, no entanto nalguns lugares do Japão, ainda se pode encontrar antigos restaurantes de *Sushi*, servindo refeições baratas, principalmente na cidade de Kyushu (Barber e Takemura, 2008).

Outros tipos de *Sushi* também acabaram por se tornar populares, destacando-se o *InariSushi*, *OmakiSushi* (nome genérico para o *Sushi* enrolado) e o *ChirashiSushi*. A grande inovação destes tipos de *Sushi* era a utilização apenas da força das mãos para realizar a prensagem (Barber e Takemura, 2008).

O *NigiriSushi* também é conhecido por *EdomaeSushi*, em função de sua origem, e era utilizado pescado, frutos do mar e algas retiradas da baía de Tóquio. Além disso, a vida “agitada” que tomava forma nas grandes cidades favorecia o estabelecimento de uma espécie de “fast-food”, as pessoas petiscavam na entrada dos estabelecimentos, nas ruas ou à beira de estradas. O estilo do *Sushi* de Tóquio ficou conhecido como estilo Edo. Segundo a história da origem do *Sushi*, o quiosque de Yohei, no bairro de Ryogoku, foi o primeiro a vender o *NigiriSushi*. Em 1923, após a cidade de Tóquio ser atingida por um terramoto, muitos

proprietários de quiosques alimentícios voltaram para as suas regiões de origem e disseminaram a receita do *Sushi* por todo o Japão (Barber e Takemura, 2008).

Finalmente, no século XX, com a globalização, o *Sushi* espalhou-se por todo o mundo. A partir de 1980, nos Estados Unidos, difunde-se a ideia de que a cozinha japonesa, especialmente o *Sushi*, é saudável, o que causou o chamado “*Sushi boom*” por todo o mundo, nomeadamente com a abertura de restaurantes de *Sushi*, rodízios de *Sushi*, entre outros. O *Sushi* contemporâneo caracteriza-se pela oferta de novos tipos de *Sushi* com a adoção de elementos culinários próprios de cada país, aliados à técnica e à inspiração dos *Sushiman* (Yoshino, 1997).

Juntamente com o *Sushi* veio o consumo de *Sashimi* que consiste em peixe cru cortado em fatias finas, cubos ou tiras, servido com óleo de soja e wasabi (pasta de rábano-bastardo) (Barber e Takemura, 2008).

Globalmente pode dizer-se que, além do sabor, a preocupação do ser humano moderno com uma alimentação saudável fez do *Sushi* um sucesso mundial.

I.4. O atual interesse no consumo de peixe cru em Portugal

Ao contrário do que era habitual na cultura gastronómica portuguesa, é hoje frequente o consumo de pratos preparados á base de peixe cru resultante da recente popularidade de pratos tradicionais japoneses como *Sushi* e *Sashimi* e também a multiplica-sente globalização e movimentação de diferentes raças e etnias por todo o mundo (Agência LUSA, 2006).

Lisboa e Porto são as metrópoles com maior concentração de restaurantes orientais, mas podem ser encontrados por todas as cidades do país. E encontra-se de tudo. Restaurantes chineses que foram obrigados a encerrar pela ASAE e que se especializaram na tradição japonesa noutros locais, e outros que limitaram-se apenas a renovar os espaços onde se encontravam e a alterar menus, outros ainda passaram a apresentar os dois tipos de restauração, japonesa e chinesa (Neves, 2008).

Com a multiplica-sente popularidade de restaurantes e “fast-food” especializados em cozinha tradicional japonesa e os sinais de apetência dos portugueses para o consumo de peixe cru

têm-se vindo a desenvolver estudos no sentido de registar a ocorrência de surtos pelo consumo deste tipo de prato (Ramos, 2011).

Mas estas alterações dos hábitos alimentares também têm gerado certas preocupações por parte de alguns consumidores que se questionam sobre a segurança de se consumir pescado que não foi previamente confeccionado. A verdade, é que estas novas práticas têm a elas associados alguns riscos para o consumidor final que resultam de o peixe não ser submetido a uma temperatura elevada que possa destruir bactérias ou outros microrganismos potencialmente perigosos presentes no peixe cru (Veiga *et al.*, 2008).

Estes microrganismos podem ter origem tanto no próprio peixe como podem resultar de uma eventual contaminação cruzada ocorrida durante a sua manipulação e preparação.

Um dos dramas da segurança alimentar no consumo de pescado cru passa pela presença de Anisakis que é um pequeno parasita esbranquiçado que tem como principais hospedeiros mamíferos marinhos, tais como baleias e golfinhos, mas que pode também ser encontrado em peixes quando estes ingerem pequenos crustáceos contaminados com a larva deste parasita. Até há alguns anos este parasita só preocupava regiões com pratos tradicionais à base de peixe cru como o Japão, a Escandinávia, a Holanda e a Costa Ocidental da América do Sul, mas devido à globalização referida anteriormente, cada vez existem mais regiões a estarem alertadas para a eventual presença deste parasita, e algumas já tomaram medidas preventivas de modo a diminuir o risco para a saúde do consumidor (Veiga *et al.*, 2008).

É o caso da nossa vizinha Espanha em que o governo aprovou um Decreto-Lei que obriga todos os restaurantes deste tipo de culinária a congelar todo o peixe destinado a ser consumido cru. Isto porque o parasita morre após alguns dias congelado a 20°C negativos. Convém referir que este método vai contra a tradição preferindo a maior parte dos restaurantes confiar num *Sushiman* treinado para detetar o peixe infetado, não sendo no entanto, como sabemos este procedimento completamente eficaz (Veiga *et al.*, 2008).

Segundo fonte oficial do Ministério da Agricultura (2006) não há necessidade de alarme, uma vez que, ao contrário de Espanha, Portugal tem controlo na descarga de peixe na lota, onde o pescado é devidamente inspecionado. Sendo que o primeiro controlo do peixe à chegada é da competência da Direção Geral de Alimentação e Veterinária, passando depois para a ASAE quando comercializado.

Segundo dados da ASAE a infecção com este parasita atinge cerca de duas mil pessoas por ano em todo o mundo, e está relacionada com os hábitos alimentares sendo mais frequente em países asiáticos, em particular o Japão, onde ocorrem mais de 95% do total de casos denunciados. Na Europa registam-se cerca de 3,5% do total de casos. No entanto devido ao aumento da popularidade da culinária asiática a nível mundial, a incidência deste tipo de infecções tem tido tendência para aumentar na Europa (Agência LUSA, 2006).

I.5. Deterioração do Pescado

Pescado fresco segundo a Legislação Comunitária são os produtos da pesca não transformados, inteiros ou preparados, incluindo os produtos embalados a vácuo ou em atmosfera modificada, que não tenham sofrido qualquer tratamento destinado à sua conservação, exceto a refrigeração (Regulamento nº 853/2004). O peixe fresco deve apresentar as seguintes características: escamas brilhantes bem aderentes à pele e barbatanas com certa resistência aos movimentos; carne firme e de consistência elástica; coloração própria à espécie; vísceras íntegras perfeitamente diferenciadas; musculatura da parede abdominal não deve apresentar autólise; odor específico, a fazer lembrar o de plantas marinhas; superfície do corpo limpa, com relativo brilho metálico; olhos transparentes, brilhantes e convexos, ocupando completamente as órbitas; brânquias rosáceas ou vermelhas, húmidas e brilhantes; ventre roliço e firme, não deixando impressão duradoura à pressão dos dedos; e ânus fechado (Brasil, 1997).

A qualidade do pescado deve ser entendida como um conjunto de propriedades, características e atributos, que atenda às exigências do mercado e do consumidor, mesmo que inconscientemente deste último (Barros, 2003). Assim a qualidade do pescado deve abordar desde sua composição intrínseca e grau de deterioração, passando pelas etapas de manuseamento, armazenamento, distribuição e venda, até às propriedades sensoriais que irão fazer com que o consumidor tenha o prazer de comer um peixe de boa qualidade (Barros, 2003).

Essa qualidade pode estar comprometida já no momento de sua captura, devido ao método de pesca utilizado e, também, á manipulação inadequada a bordo. Esses dois fatores são de fundamental importância para a futura conservação do pescado. O primeiro por ter uma grande influência em relação ao intervalo de tempo necessário para que o *rigor mortis* se

instale e o segundo por evitar e/ou retardar alterações autolíticas e microbianas do pescado (Barros, 2003).

Como o pescado é uma das matérias-primas alimentares mais perecíveis devido às suas características, pouco tecido conjuntivo, alta atividade de água, elevado teor de gorduras insaturadas e de nutrientes disponíveis, é necessário tomar certos cuidados relativos à sua manipulação, abrangendo toda a cadeia de obtenção. O pescado passa por três fases desde a sua captura até à putrefação: *pré rigor mortis*, *rigor mortis* e *pós rigor mortis* (Barros, 2003). O *pré rigor* caracteriza-se pela glicólise anaeróbica, que se distingue pela formação de ácido láctico e consequente diminuição do pH do músculo. Além disso, ocorre degradação do ATP por desfosforilação e desaminação levando à fusão da actina e da miosina, formando o complexo ato-miosina, estabelecendo assim o *rigor mortis*. O valor final do pH do músculo em peixes de carne vermelha cai para valores em torno de 5,6 a 5,8, e em peixes de carne branca e pelágicos o limite inferior chega a 6,0-6,2 (Barros, 2003). O *rigor mortis* ocorre após a decomposição do ATP, produzindo-se ADP (adenosina difosfato), acompanhada da desfosforilação de creatina-fosfato (CP) cujo fósforo inorgânico é utilizado para a regeneração do ATP.

Quando não há mais CP disponível, essa degradação do ATP ocorre de forma irreversível. Esse gasto do ATP ocasiona o aumento da rigidez muscular devido à formação do complexo actina-miosina. Outra característica dessa fase é a desoxigenação da hemoglobina, evidenciada pelo escurecimento das brânquias e aglutinação das franjas branquiais (Barros, 2003).

Com o objectivo de aumentar o tempo de instalação do *rigor mortis*, são utilizados vários métodos no momento da captura e abate para garantir um maior prazo de vida de prateleira. Desses métodos é de salientar as práticas higio-sanitárias da embarcação pesqueira, água e gelo de boa qualidade e suficientes para todos os processos sanitários a bordo, isolamento térmico adequado dos porões, método adequado para a captura da espécie desejada, evisceração imediata e retirada da cabeça e guelras a bordo, lavagem com água clorada (50 ppm) e o “stock” de gelo até à chegada ao porto (Vieira *et. al*, 2003).

Diversos autores (Vieira *et. al*, 2003, Guimarães, 2000, Ogawa e Maria, 1999 e Mayer e Wand, 1991) destacam a importância da refrigeração e do congelamento no incremento do período de vida útil do pescado, permitindo que produtos frescos de elevada qualidade

sensorial estejam disponíveis em locais distantes dos de captura. Além disso, sabe-se que fatores como produção de histamina e o aparecimento de “black spot” (mancha negra) são inibidos pela rápida colocação em gelo após a captura, aumentando a qualidade higio-sanitária desse pescado.

O *pós rigor mortis* caracteriza-se pela decomposição de aminoácidos, ocorrendo o desdobramento do ATP e formação de amônia a partir da ureia. Essa reação é chamada de autólise, e deve-se à ação de protéases próprias do músculo e à ação de exopeptidases de origem microbiana, devido principalmente ao facto de apesar do pH baixar no pescado não ser suficiente para inibir o desenvolvimento de microrganismos proteolíticos (Barros, 2003, Beato, 2002 e Ogawa e Maria, 1999). De entre estes destacam-se *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, e *Bacillus*. Dessas reações, o azoto é a base volátil mais representativa, medido através da análise do Azoto Base Volátil Total (ABVT). Dessa forma constitui-se um índice químico utilizado para estimar o grau de frescura das espécies de pescado. Existem três categorias de espécies para as quais se encontram estabelecidos valores limites de ABVT, sendo os limites de: 25mgN/100g de tecido muscular para as espécies *Sebastes* spp., *Helicolenus dactylopterus* e *Sebastichthys capensis*; 30mgN/100g de tecido muscular para as espécies que pertencem à família *Pleuronectidae* (à excepção do alabote: *Hippoglossus* spp.); e 35mgN/100g de tecido muscular para *Salmo salar*, espécies que pertencem à família *Merluccidae* e espécies que pertencem à família *Gadidae*. Estes limites estão estabelecidos no Ponto 1, Capítulo I, Secção II, Anexo II do Regulamento (CE) N.º 2074/2005 da Comissão de 5 de dezembro de 2005. Esses valores são adotados pelos órgãos oficiais de inspecção de países como Alemanha, Argentina, Austrália e Brasil. Além dos microrganismos deteriorativos, o pescado pode constituir-se como um importante veículo de microrganismos patogénicos para o ser humano, responsáveis por diversas enfermidades. Sabe-se também que a contaminação por manipulação e processamento inadequados ou mesmo utilização de equipamentos e utensílios contaminados são fatores importantes como veículos de contaminação dessas bactérias para o pescado (Muratori, 2000).

De entre os agentes potencialmente patogénicos, associados ao consumo de carne de peixe, estão *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*. Ambos são decorrentes de fatores externos ao pescado, provenientes também da contaminação das águas das bacias pesqueiras pelas descargas de efluentes de esgotos (Germano *et al.*, 1993).

Alguns autores têm relatado a importância de *Salmonella* nas Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), especificamente nos pescados. Vieira *et al.*, (2003) cita autores relatando que no Japão, onde é muito comum o consumo de pratos à base de frutos do mar, 70% das DTA que ocorrem nos meses de verão são originárias de produtos da pesca. Mohamed Hatha e Lakshmanaperumaisamy (1997) encontraram *Salmonella* em 14,25% das amostras de peixes e 17,39% nas de crustáceos em mercados de peixes em Coimbatore, Sul da Índia.

I.6. Perigos microbiológicos em Segurança Alimentar no pescado cru

I.6.1. Caracterização da Microbiota mais frequentemente encontrada no pescado

Os peixes e os crustáceos podem ser capturados de fontes naturais e de zonas de aquacultura. Na sua generalidade, são ricos em proteínas e compostos azotados não proteicos, sendo os seus conteúdos de gordura variáveis consoante o tipo de peixe e a sua sazonalidade (Ray e Bhunia 2008). A população microbiana nestes produtos varia muito com o nível de poluição e temperatura da água. De uma forma geral, os músculos dos peixes e mariscos são estéreis, no entanto as escamas, as guelras e os intestinos abrigam microrganismos, entre os quais bactérias pertencentes a diversos grupos taxonómicos, vírus, parasitas como protozoários, podendo estar presentes no alimento cru (Ray e Bhunia 2008).

Devido ao facto dos produtos de pescarias, nomeadamente o peixe fresco, serem um alimento básico de consumo frequente, torna-se necessário saber qual a microbiota presente no mesmo. No caso dos produtos alimentares pescados em ambientes marinhos, encontram-se microrganismos halófilos do género *Vibrio* spp., bem como, coliformes, microrganismos dos géneros *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Flavobacterium*, *Enterococcus*, *Micrococcus* e agentes patogénicos como *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e *Clostridium botulinum* tipo E, *Aeromonas hydrophila* e *Plesiomonas shigelloides* estes últimos sendo patogénicos oportunistas (Ray e Bhunia 2008).

Quando os produtos da pesca são capturados em águas poluídas, há grande probabilidade de conterem microrganismos que podem multiplicar-se rapidamente, porque a a_w e o pH elevados do tecido, disponibilizam grandes quantidades de compostos azotados não proteicos (Ray e Bhunia, 2008).

Muitas das espécies bacterianas referidas são *psicrófilos*, pelo que podem multiplicar-se a temperatura de refrigeração e os agentes patogénicos podem permanecer viáveis por um longo período de armazenamento (Ray e Bhunia, 2008).

I.6.2. Microrganismos no Pescado

Os microrganismos indicadores são espécies ou grupo de microrganismos que indicam a possível presença de agentes patogénicos, cuja presença em níveis elevados, refletem pontos de segurança inadequados durante o tratamento do pescado (Mossel *et al.*, 1995). De uma forma geral, estes microrganismos são frequentemente utilizados para avaliar o estado sanitário dos produtos alimentares (Jay, 2002). Embora não haja especificações sobre quais os microrganismos indicadores mais úteis, atualmente sabe-se que algumas destas bactérias são encontradas no trato digestivo e fezes dos animais e dos seres humanos. Bactérias como os coliformes totais, coliformes fecais, Enterococos e mais recentemente *Escherichia coli* (*E. coli*), foram estabelecidos como indicadores preferenciais (Noble *et al.*, 2003).

I.6.2.1. Microrganismos mesófilos

A contagem de colónias aeróbias representa o número total de bactérias encontradas nos alimentos. Esta contagem engloba microrganismos, cuja temperatura ideal de multiplicação varia entre os 25 e 40°C (Ray e Bhunia, 2008). Em produtos frescos, a contagem destes microrganismos indica a eficácia ou não das boas práticas de higiene usados, durante o seu processamento, manuseamento e armazenamento (Ray e Bhunia, 2008). Para além, dos fatores anteriormente descritos, contagens elevadas destes microrganismos podem estar associados a longos processos de refrigeração ou à não refrigeração dos mesmos.

I.6.2.2. Microrganismos psicotróficos

Os microrganismos psicotróficos têm a capacidade de se multiplicarem a temperaturas que vão dos 0°C aos 20°C, mas a sua temperatura ótima de multiplicação é 15°C, são encontrados nos alimentos mas também nos solos e no ambiente. São responsáveis por terem uma ação deteriorativa nos alimentos. Algumas estirpes podem ser tóxicas para o homem, animais e plantas (Ray e Bhunia, 2008).

I.6.2.3. *Enterobacteriaceae*

Esta família engloba vários géneros e espécies de bastonetes Gram-negativos, com muitas propriedades comuns. Embora possam ser encontrados de forma ampla na natureza, a maioria é encontrada no intestino de animais e homem. São identificadas através de provas bioquímicas. A forma de prevenção da sua presença passa pelas boas práticas na manipulação e preparação dos alimentos assim como na ingestão de água fervida e filtrada. Devido à riqueza de membros desta família, optamos por somente assinalar as principais espécies que podem estar envolvidas nas patologias humanas, como *Salmonella* e *Escherichia coli* (Ray e Bhunia, 2008).

As *Enterobacteriaceae* ocorrem em produtos do pescado como resultado de contaminação do Homem ou dos animais. Esta contaminação tem sido normalmente associada à contaminação fecal ou à poluição das águas naturais ou de ambientes aquáticos, onde estes organismos podem sobreviver durante um longo período de tempo, ou à contaminação direta dos produtos durante o processamento (FAO, 1997).

Uma boa higiene pessoal e uma educação sanitária dos manipuladores de alimentos são, por isso, essenciais no controlo das doenças causadas por *Enterobacteriaceae*. Um tratamento adequado da água e a eliminação sanitária dos esgotos constituem, igualmente, aspetos essenciais num programa de controlo (FAO, 1997).

I.6.2.4. Bactérias do ácido láctico

As *Bactérias do ácido láctico* (BAL) são um grupo morfológicamente heterogéneo com cocos e bacilos que podem apresentar-se individualmente ou em cadeia, são Gram-positivas, não esporuladas, anaeróbias facultativas, ou seja, capazes de fazer a fermentação quer em anaerobiose quer em aerobiose, mas nesta última de forma mais lenta, são capazes de se multiplicar em ambientes com um intervalo de temperaturas entre 5°C e 45°C e com pH 3,8 (Lima *et al.*, 2009). O principal produto final da fermentação de açúcares, como o próprio nome indica é o ácido láctico, estando presentes na acidificação dos produtos alimentares destinados ao consumo humano e animal.

I.6.2.5. *Clostridium spp.*

O Género pertence à família *Clostridiaceae*. São anaeróbios formadores de esporos resistentes, tendo como habitat natural o trato intestinal de animais e homem. De maneira

geral são bastonetes móveis, Gram-positivos, grandes e longos, com comprimento variando entre 3 a 8 µm. Os esporos são geralmente mais largos e de difícil coloração (Delazari *et al.*, 1984).

A contaminação do pescado por esporos de *Clostridium* spp. ocorre principalmente no intestino, na superfície da pele ou nas brânquias a partir da água ou dos sedimentos (Delazari *et al.*, 1984).

I.6.2.6. *Clostridium perfringens*

Este pertencendo também à família *Clostridiaceae* diferencia-se por ser formador de toxina. Este apresenta-se isolado ou aos pares, e pode produzir várias toxinas, causando quadros clínicos diversos. Entre eles, intoxicação alimentar, gangrena gasosa (mionecrose), infecções intra-abdominais, cutâneas e subcutâneas.

Clostridium perfringens é encontrado disperso no ambiente, em locais como o solo, estando mais difundido no meio ambiente que qualquer outra bactéria patogénica, nos intestinos de animais domésticos, animais selvagens e humanos. Também pode ser encontrado em esgotos e em regiões propensas a contaminações por animais. Multiplica-se bem em alimentos ricos em proteínas como carne bovina, aves, molhos, alimentos secos ou pré-cozidos e leite. Em menor quantidade também em produtos avícolas, carne de porco, cordeiro, peixe, camarão, caranguejo e leguminosas (Schneider, *et al.*, 2010).

As infecções por *Clostridium perfringens* ocorrem normalmente em alimentos que foram preparados em grandes quantidades e mantidos em local quente antes de servir. Os surtos acontecem frequentemente em instituições como hospitais, cantinas escolares, prisões e asilos, ou em eventos com alimentos servidos (Grama, *et al.*, 2010).

I.6.2.7. Coliformes totais

Coliformes totais são bactérias aeróbias facultativas, Gram-negativas, não formadoras de esporos e fermentadoras da lactose, produzindo ácido e gás em apenas 48 horas a 35°C (Kornacki, *et al.*, 2001). Podem multiplicar em pH entre 4,4 e 9,0 e em temperaturas que variam entre -2°C e 50°C, sendo no entanto a multiplicação muito lenta em alimentos refrigerados (Jay, 2005).

O grupo é composto principalmente por bactérias dos géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* (Franco e Langarf, 2005; Jay, 2005). Destes apenas *E. coli* tem como *habitat* o trato intestinal do homem e de animais de sangue quente (Feng, *et al.*, 2002; Franco e Langarf, 2005; Jay, 2005), os restantes géneros para além de serem encontrados nas fezes também estão presentes em outros ambientes como o solo e vegetais. No entanto é de salientar que a presença de coliformes totais em alimentos não representa necessariamente uma contaminação recente ou a presença de enteropatogénicos (Franco e Langarf, 2005).

Os Coliformes totais são utilizados frequentemente como indicadores da qualidade higiénica do pescado, como não se multiplicam nem se mantêm viáveis na água por muito tempo a contaminação do pescado ocorre essencialmente através dos manipuladores (Cardoso *et al.*, 2001).

I.6.2.8. *Pseudomonas* spp.

A família das *Pseudomonadacea* à qual pertence o género *Pseudomonas* spp. apresenta um critério para que uma bactéria em forma de bastonete direito ou ligeiramente curvo com 0,5 – 1,0 µm por 1,5 – 4,0 µm, Gram-negativo, aeróbio, não formador de endósporos, esse critério reside no modo de inserção dos flagelos que é polar, simples ou múltiplos. São no entanto critérios de valor limitado conduzindo por isso a uma excessiva extensão dos elementos desta família. As referidas características são partilhadas por mais de duas dezenas de géneros atualmente aceites, sendo então o grupo de bactérias genericamente conhecido por “*Pseudomonas*”. Os membros do género *Pseudomonas* multiplicam-se a pH neutro e a temperaturas na gama das bactérias mesófilas (entre 25 e 40 °C), no entanto multiplicam-se bem a temperaturas de refrigeração e são resistentes a muitos desinfetantes usados na Indústria Alimentar. Desencadeiam a formação de diversos produtos que afetam negativamente o aroma e o sabor dos alimentos. Podem ainda ser usadas como parâmetro indicador de higiene (Sá-Correia, 2000)

O género *Pseudomonas* é constituído por microrganismos psicrófilos (Ferreira *et al.*, 2010) responsáveis por perdas económicas significativas (Braun e Sutherland, 2003), pelo facto de serem bactérias importantes na degradação do peixe ou produtos de pesca, armazenados em aerobiose sob condições de refrigeração (Hubbs, 1991; Gram e Huss, 1996; Koutsoumanis e Nychas, 1999). Espécies de *Pseudomonas* juntamente com microrganismos da espécie *Shewanella putrefaciens* fazem parte da microbiota degradativa específica de peixes

(Gillespie, 1981; Lima, 1981; Gram e Huss, 1996). Geralmente a deterioração da qualidade do peixe fresco é detetável através da perda de sabor (sabor doce) (Gram e Huss, 1996). Odores e sabores frutados, sulfídricos e de podridão são característicos de espécies de *Pseudomonas* presentes nos peixes armazenados em gelo (Miller III *et al.*, 1973; Edwards *et al.*, 1987).

I.6.2.9. *Shewanella putrefaciens*

Esta bactéria foi isolada pela primeira vez em produtos lácteos por Dreby em 1931 e classificada como *Achromobacter putrefaciens*, mais tarde em 1985 foi renomeada por MacDonell e Colwell com o nome pelo qual é hoje em dia conhecida, *Shewanella putrefaciens* (Richards, *et al.*, 2008). As espécies deste género estão todas associadas ao meio aquático, particularmente oceânico. E está por isso associada ao aparecimento do cheiro a podre em peixes. São bacilos oxidativos e não oxidativos, Gram-negativos, aeróbios estritos e apresentam como principal atributo a produção de H₂S (Sulfureto de Hidrogénio) gasoso que lhes confere uma coloração negra. Podem ser ocasionalmente associados como um microrganismo patogénico para o Homem, mas é mais frequente encontra-lo em reservatórios aquáticos (Khashe *et al.*, 1998).

I.6.2.10. *Photobacterium phosphoreum*

Esta bactéria pertence á família *Vibrionaceae*. São bactérias Gram-negativas, anaeróbios facultativos, móveis com três flagelos, com um diâmetro que varia entre 0,8-1,3 µm, multiplica-se a temperaturas entre 4-35°C mas com uma temperatura ótima de 18-25°C. *Photobacterium phosphoreum* distingue-se de outros géneros de bactérias por apresentar uma característica específica, a luminescência. É responsável por causar deterioração em peixe embalado em atmosfera modificada com CO₂, são resistentes ao dióxido de carbono reduzindo por isso o óxido de trimetilamina a trimetilamina, característica que explica a sua importância na deterioração do pescado (Daalgard *et al.*, 1997).

I.6.2.11. *Bacillus cereus*

Bacillus é a espécie tipo da família *Bacillaceae*, compreende espécies facultativas e formadoras de esporos. São na sua maioria saprófitas, sendo apenas duas espécies consideradas importantes clinicamente para o homem, *Bacillus anthracis* e *Bacillus cereus*.

São bacilos Gram-positivos de largas dimensões, podendo ter 1x3-5 µm, produtores de esporos quando colocados a se multiplicar em aerobiose (Lopes 2000).

Bacillus cereus é frequentemente associado a diferentes situações de natureza patológica como infeções cutâneas sendo no entanto a toxi-infeção alimentar a que apresenta maior significado a nível clínico, por serem resistentes á confeção dos alimentos e às más condições de armazenamento, os esporos desta espécie podem germinar e produzir enterotoxinas (Lopes, 2000).

Bacillus cereus está difundido na natureza, encontra-se no solo e pode ser veiculada pelo pó e pela água, podendo desta forma contaminar o pescado (Portal de Segurança Alimentar, 2013).

I.6.2.12. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus são bactérias que vivem em contacto íntimo com o Homem, numa relação habitual de mutualismo. Constituem parte da população microbiana indígena da pele e mucosas, sendo *Staphylococcus aureus* um dos principais microrganismos patogénicos. *Staphylococcus aureus* pertence à família *Micrococcaceae*, sendo cocos Gram-positivos, com diâmetro de 0,5 a 1,5 µm, imóveis, capsulados e não esporulados. São anaeróbios facultativos, oxidase negativos e catalase positivos (Melo, 1989). São capazes de se multiplicar a temperaturas compreendidas entre 18°C e 40°C com uma temperatura ótima de multiplicação de 35°C, o pH ótimo de multiplicação encontra-se entre 6 e 7, mas consegue perfeitamente multiplica-se na faixa de 4,0 a 9,8 (Jay, 2005). Só *Staphylococcus aureus* produz a enzima coagulase.

São organismos que podem ser encontrados, na água, ar, poeira, leite, esgotos, chão, superfícies e todos os materiais que entram em contacto com o Homem, sendo no entanto a sua principal origem e habitat o nariz, garganta e pele do Homem e de outros animais (FAO, 1997). Os esgotos quando perto da zona costeira poluem as águas e estas por sua vez contaminam o pescado que vai ser posteriormente consumido. O pescado pode estar contaminado com *Staphylococcus aureus* provenientes de manipuladores infetados ou do ambiente. Mais frequentemente, a contaminação tem origem num indivíduo com uma infeção nas mãos, uma constipação ou dores de garganta (FAO, 1997).

A dimensão de portadores humanos de *Staphylococcus aureus* pode atingir 60% de indivíduos saudáveis, havendo cerca de 25 a 30% da população portadora de estirpes produtoras de enterotoxinas (Ahmed, 1991).

I.6.2.13. *Listeria* spp.

Género pertencente à família *Listeriaceae*. São bastonetes curtos, de 0,5 por 0,8 a 2,5 µm, considerados por muitos autores como coco bacilos, podem variar morfológicamente, tendendo algumas vezes para formas cocoides ou mesmo filamentosas. Não formam esporos, são catalase positivos, oxidase negativos e fermentam a glicose produzindo ácido, mas não gás. Das diferentes espécies que constituem o género, atualmente, a mais importante é a *Listeria monocytogenes* (Exposto, 2000).

Esta por ser uma espécie que se adapta bem em diferentes habitats, como sendo um microbiota normal em diferentes animais e homem, assim como em fontes ambientais, tais como água e solo. A sua transmissão acontece por contacto direto com o animal ou fezes infetadas e/ou pelo consumo de alimentos contaminados. A ingestão de *Listeria monocytogenes* pode levar a casos de infeção alimentar com situações de morte em casos não tratados (Ben Embarek e Huss, 1992).

Pode ser isolada do solo, vegetação, produtos alimentares, incluindo o peixe e produtos derivados, e cozinhas domésticas. A maior parte das estirpes de *Listéria* é, provavelmente, não patogénica. O isolamento frequente desta espécie bacteriana a partir do pescado (Weagant *et al.*, 1989; Rørvik e Yndestad, 1991) e a demonstração da sua potencial proliferação em salmão fumado conservado em refrigeração (Ben Embarek e Huss, 1992; Guyer e Jemmi, 1991; Rørvik *et al.*, 1991) mostra que o pescado pode ter um papel importante na transmissão de *Listeria monocytogenes*.

I.6.2.14. *Salmonella* spp.

O género *Salmonella* spp. pertence à família *Enterobacteriaceae*. São bastonetes curtos, Gram-negativo, fermentadores, não esporulados, na maioria móvel por flagelos peritríquios (exceto *S. gallinarum* e *S. pullorum*), de metabolismo aeróbio ou facultativamente anaeróbio. A temperatura ideal situa-se na faixa de 35 a 37°C, sendo a mínima de 5°C e a máxima de 47°C. O pH ótimo para seu desenvolvimento fica próximo de 7,0 e valores superiores a 9,0 e

inferiores a 4,0 são bactericidas. Com relação à concentração de sal, não toleram concentrações superiores a 9% (Jay, 2002).

O habitat natural de *Salmonella* spp. é o trato gastrointestinal de mamíferos, aves e répteis. Portanto, *Salmonella* spp. atinge os ambientes aquáticos, e por sua vez os peixes através de contaminação fecal. Isso explica a detecção ocasional de *Salmonella* a partir de peixes e produtos da pesca (Sanath Kumar *et al.*, 2003).

I.6.2.15. *Escherichia coli*

A espécie *E. coli* é um bacilo Gram-negativo, não esporulado, anaeróbio facultativo, habitante do trato intestinal de humanos e de animais de sangue quente (Heredia *et al.*, 2009). Por este facto, é usado como organismo indicador de contaminação fecal e da possível presença de patogénicos entéricos nos alimentos e na água (Ray e Bhunia, 2008). As infeções causadas pelas estirpes patogénicas de *E. coli* podem ser transmitidas essencialmente, através de três vias, o contacto direto com os animais, o contacto com os humanos, e/ou o consumo de alimentos contaminados (Pelczar *et al.*, 1997).

Algumas estirpes de *E. coli* conseguem multiplicar-se em ambientes com temperaturas entre 7 e 46°C e têm uma temperatura ótima de multiplicação que varia entre 35 e 40°C. As estirpes patogénicas sobrevivem, geralmente, às temperaturas de refrigeração, apesar de ocorrer uma ligeira redução após uma a cinco semanas de armazenamento (Varman e Evans, 1996).

Pode ser isolada de ambientes poluídos por matéria fecal ou esgotos que estejam junto à zona costeira onde o pescado é posteriormente capturado, o microrganismo pode sobreviver durante bastante tempo neste ambiente (Rhodes e Kator, 1988; Jiménez *et al.*, 1989). Não há indicação de que o pescado seja uma fonte importante de infeção por *E. coli* (Ahmed, 1991). A maior parte das infeções parece estar relacionada com a contaminação da água ou com a manipulação do pescado em condições não higiénicas. No entanto, foi demonstrado recentemente, que a *E. coli* pode ser igualmente encontrada em águas tropicais quentes não poluídas, onde pode sobreviver indefinidamente (Hazen, 1988).

I.6.2.16. *Vibrio* spp.

O género *Vibrio* spp., pertence à família *Vibrionaceae*, é constituído de bacilos Gram-negativos que diferem de outros bastonetes pela sua morfologia, lembrando uma vírgula e sendo móveis e bastante rápidos e com comprimento aproximado de 2 a 4µm. Multiplicam-se

melhor em meios com pH alcalinos, entre 7,5 e 8,5 e a temperatura ótima de multiplicação é de 37°C. Apresenta uma característica própria que é serem halofílicos restritos, exigindo um mínimo de 1% de cloreto de sódio para a sua multiplicação. Este género compreende várias espécies, sendo a mais importante o *Vibrio cholerae*, responsável pela cólera. Outra espécie também com elevada importância é o *Vibrio parahaemolyticus*, que possui um papel bastante definido nas toxi-infeções alimentares (Vieira, 2004)

A maior parte dos *Vibrio* spp. são de origem marinha. O género inclui um certo número de espécies que são patogénicas para o Homem. As espécies patogénicas são principalmente mesófilas, isto é, ocorrem, em geral, em águas tropicais e em número mais elevado em águas temperadas nos finais do verão ou princípios do outono. Os surtos de *V. parahaemolyticus* têm sido, frequentemente, associados a contaminações cruzadas ou a abusos de tempo/temperatura de pescado cozinhado. O Japão é uma exceção dado que o peixe cru é o principal veículo de infeção pelo *V. parahaemolyticus*. Em relação aos outros *Vibrio* spp., o consumo de marisco cru, em especial ostras, constitui a principal causa de infeção. Um aspeto importante é a impressionante taxa de proliferação dos *Vibrio* spp. no peixe cru, mesmo a baixas temperaturas. Isto permite que, mesmo quando inicialmente pouco numerosos, aumentem drasticamente sob condições impróprias de captura, processamento, distribuição e armazenamento (FAO, 1997).

I.6.2.17. Bolores e Leveduras

Os bolores multiplicam-se mais lentamente do que as bactérias em alimentos pouco ácidos ($\text{pH} > 4,6$) e com elevada atividade da água (a_w). No entanto, em alimentos ácidos e com baixo a_w , os bolores multiplicam-se mais rapidamente que as bactérias.

Normalmente, as leveduras apenas são responsáveis pela deterioração dos alimentos onde se instalam, não constituindo um problema de segurança sanitária, podendo ainda ser utilizadas como indicadores específicos de contaminações cruzadas (Baptista e Linhares, 2005).

A redução deste risco passa pela implementação de boas práticas de higiene, diminuição do tempo de armazenamento, respeito pelas temperaturas de refrigeração ou congelação, redução do contacto com o ar (embalagem), adição de ácidos e conservantes (Baptista e Venâncio, 2003).

I.6.2.18. Vírus

A transmissão de doenças virais ao Homem através do consumo de pescado é conhecida desde os anos 50 e, no Homem as viroses entéricas são a principal causa de doenças associadas ao consumo de marisco. Atualmente existem mais de 100 vírus entéricos. De acordo com Kilgen e Cole (1991), apenas alguns causaram doenças relacionadas com o consumo de pescado. São os seguintes:

- ✓ Vírus da Hepatite Tipo A;
- ✓ Vírus Norwalk;
- ✓ Calicivírus;
- ✓ Astrovírus.

Os vírus são inertes fora da célula viva hospedeira, mas podem sobreviver. Ou seja não se replicam na água ou no pescado, independentemente do tempo, temperatura ou outras condições físicas. A sua presença no pescado resulta apenas de contaminação através de manipuladores de alimentos infetados e/ou através de água poluída (Gerba e Goyal, 1978).

A dose infecciosa dos vírus é provavelmente muito menor do que a das bactérias para causar doenças relacionadas com a ingestão de alimentos (Cliver, 1988). Para o Homem, a dose infecciosa mínima de alguns vírus entéricos aproxima-se da dose mínima detetável em sistemas de ensaio laboratoriais, utilizando culturas de células (Ward e Akin, 1983).

O Homem e os animais são a fonte dos vírus entéricos. Estes encontram-se em grandes quantidades nas fezes de pessoas infetadas, alguns dias ou várias semanas, após a ingestão/infeção e de cordo com o vírus. A contaminação fecal direta ou indireta é a fonte mais comum de contaminação dos alimentos (FAO, 1997).

Os moluscos bivalves apresentam-se no topo da lista dos veículos alimentares envolvidos em surtos de doenças virais. No entanto, um outro veículo importante é os alimentos prontos a consumir, preparados por manipuladores infetados. Os dados disponíveis indicam que quase todos os alimentos que entram em contacto com as mãos e que não sofrem, subsequentemente, um tratamento térmico substancial, podem transmitir estes vírus (FAO, 1997).

Com apenas algumas exceções, todos os casos referidos de infecções virais associadas ao pescado têm sido resultantes do consumo de moluscos crus ou mal confeccionados (Kilgen e Cole, 1991). Há, no entanto, uma clara evidência de que o VHA tem sido transmitido em virtude de práticas não higiênicas durante o processamento, a distribuição e o manuseamento dos alimentos (Ahmed, 1991). Estas doenças associadas ao consumo de pescado são muito frequentes. De acordo com um estudo realizado por Ahmed (1991), nos Estados Unidos são comunicados, anualmente, ao Center of Disease Control (CDC), entre 20 000 a 30 000 casos, e um dos maiores surtos de doenças de que existe registo, foi um caso de hepatite na China, em 1988, que envolveu 290 000 pessoas. A investigação revelou que a fonte e o modo de transmissão foram o consumo de amêijoas contaminadas e mal cozidas (Tang, *et al.*, 1991).

De acordo com Gerba (1988), a sobrevivência de vírus no ambiente e nos alimentos depende de um determinado número de fatores tais como a temperatura, a salinidade, a radiação solar e a presença de sólidos orgânicos. Assim sendo os vírus entéricos são capazes de sobreviver durante vários meses na água do mar a temperaturas inferiores a 10°C, período muito superior, por exemplo, ao das bactérias coliformes (Melnick e Gerba, 1980). Deste modo, há pouca ou nenhuma correlação entre a presença de vírus e a das bactérias consideradas usualmente como indicadores de poluição fecal.

I.6.3. Fatores que influenciam a Microbiota do alimento

Normalmente, os alimentos possuem uma população mista de microrganismos, incluindo diferentes espécies e estirpes de bactérias, bolores e leveduras, podendo algumas delas estar presentes em níveis mais elevados do que outras (Ray e Bhunia 2008).

Os microrganismos (exceto os vírus), multiplicam-se nos alimentos, de acordo com as condições dos mesmos (fatores intrínsecos), bem como, sob as condições de armazenamento dos alimentos (fatores extrínsecos). A influência de cada fator sobre a multiplicação microbiana, não pode ser estudada de forma independente, pois todos eles estão interligados e influenciam a vários níveis (Ray e Bhunia 2008).

I.6.3.1. Fatores Extrínsecos

Os fatores extrínsecos são muito importantes para medir a multiplicação microbiana nos alimentos, dado que estes incluem as condições ambientais às quais os alimentos são submetidos, nomeadamente a temperatura, a humidade relativa e o ambiente gasoso. Tanto a

humidade relativa do ar, como a atmosfera modificada de armazenamento, são fatores que podem influenciar respetivamente a a_w e o Potencial oxido-redução (Eh) dos alimentos (Ray e Bhunia 2008).

I.6.3.2. Fatores Intrínsecos

São vários os fatores intrínsecos nos alimentos que afetam o comportamento microbiano, entre os quais podemos destacar, os nutrientes disponíveis, os fatores de multiplicação e/ou inibidores, a a_w , o pH, e o ABVT. Tal como referido anteriormente, estes fatores têm uma ação combinada na multiplicação microbiana (Ray e Bhunia 2008). Destaquemos o pH e o ABVT por terem sido os fatores intrínsecos estudados na componente prática do nosso trabalho.

I.6.3.2.1. pH

O pH, indica a concentração do ião hidrogénio num sistema, sendo um valor muito variável consoante o tipo de alimento (Ray e Bhunia 2008). De acordo com esta medida, os alimentos podem ser classificados em alimentos ricos em ácidos, cujo valor de pH é $<4,6$ e em alimentos de baixa acidez, cujo valor de pH é $\geq 4,6$ (Ray e Bhunia 2008).

A maioria das frutas e dos sumos de frutas, os alimentos fermentados e as saladas, apresentam valores de pH baixos (i.e. são ricos em ácido) e estão incluídos no primeiro grupo, enquanto que a maioria dos legumes, a carne, o peixe, o leite e as sopas, possuem baixa acidez, pelo que estão incluídas no segundo grupo (Ray e Bhunia 2008). Para os alimentos ricos em ácido, existe um limite mínimo de acidez, que normalmente se encontra acima dos 3,0 (exceto para algumas frutas cítricas), no caso dos alimentos de baixa acidez, existe um limite máximo, que normalmente não excede os 6,0 (Ray e Bhunia 2008).

O efeito do pH sobre a multiplicação e viabilidade das células microbianas é bastante acentuado, na medida que para cada espécie existe um valor de pH ideal dentro de uma gama de valores que favorecem a multiplicação (Ray e Bhunia 2008). Numa forma generalizada, os bolores (pH 1,5 – 9,0) e as leveduras (pH 2,0 – 8,5) comparativamente com as bactérias têm a capacidade de se multiplicar sob valores de pH mais baixos e são mais tolerantes a variações de pH. No entanto, as bactérias Gram-negativas (pH 4,5 – 9,0) são mais sensíveis a pH baixos do que as bactérias Gram positivas (pH 4,0 – 8,5) (Ray e Bhunia 2008).

Tabela 1: Valores Mínimos, Máximos e Óptimos de pH

Microrganismos	Mínimo	Ótimo	Máximo
Bolores	1,5-3,5	4,5-6,8	8,0-11
Leveduras	1,5-3,5	1-6,5	8,0-8,5
Bactérias	4,5	6,5-7,5	11
Bactérias Acépticas	2	5,4-6,3	9,2
Bactérias Lácticas	3,2	5,4-6,5	10,5

Fonte: Bourgeois *et al.*, (1996)

O valor de pH deve manter-se baixo e controlado em pescado para evitar que este se torne uma superfície de multiplicação de microrganismos. Segundo a tabela 1 é possível perceber pelos valores apresentados que se o pH do pescado aumentar para um valor ótimo de multiplicação o número de bolores e leveduras na superfície exposta ao ar irá também aumentar, provocando assim a deterioração do pescado e o aumento de microrganismos deteriorativos (Oetterer, 2003).

O índice de pH do pescado não deve ultrapassar 6,8 e normalmente encontra-se próximo de 6,0 (Oetterer, 2003).

I.6.3.2.2. ABVT

A regulamentação europeia refere-se à determinação do azoto básico volátil total como sendo um método que permite determinar se o pescado está apto para consumo assim como quantificar o seu grau de alteração (Fontes, *et al.*, 2007).

A determinação de ABVT nos produtos da pesca contabiliza todos os compostos azotados voláteis existentes na amostra, principalmente os níveis de amoníaco, Trimetilamina (TMA) e Dimetilamina (DMA) que vão aumentando com a degradação quer enzimática quer microbiana. O resultado destes testes tem como objetivo a definição do grau de frescura do produto da pesca (Özogul, 1999).

As Bases Voláteis Totais (BVT) são causadas por atividades microbianas no pescado. Se for consumido um alimento com alto valor de BVT, pode ocorrer uma intoxicação no consumidor. As bases voláteis estão relacionadas diretamente com a decomposição do pescado (Germano, *et al.*, 1998).

I.6.4. Análise de Perigos e Controlo dos Pontos Críticos (HACCP)

Atualmente o sistema HACCP, é cada vez mais reconhecido e aceite internacionalmente como metodologia no controlo alimentar, pelo facto de ser uma ferramenta de gestão de segurança que não só melhora a eficácia das operações e a qualidade dos produtos, ou seja dá garantias de alimentos seguros, bem como também se tornou num requisito de satisfação dos clientes e dos consumidores, por ser para estes uma garantia de que se seguem os requisitos legais instituídos no Regulamento (CE) nº 852/2004. Assim o HACCP pode ser incorporado em programas de gestão da qualidade total (TQM), (Vanne *et al.*, 1996).

Esta ferramenta possui dois componentes essenciais, em primeiro a análise ou avaliação dos perigos associados com a produção e transformação de um determinado tipo de alimento, por exemplo os microrganismos patogénicos que possam estar presentes num determinado alimento, e em segundo lugar identificar os pontos críticos de controlo (PCC), isto é, as medidas de controlo adequadas que devem ser implementadas nos locais de processamento dos alimentos, a fim de evitar qualquer risco para os consumidores (Ray e Bhunia, 2008).

Na produção alimentar, o maior risco é o de contaminação microbiológica, pelo que o HACCP, é a medida adotada internacionalmente para garantir a segurança do consumidor (Vanne *et al.*, 1996).

Um dos conceitos básicos associados a este sistema é que, quando devidamente concebido, implementado, monitorizado, verificado e analisado, permite garantir a qualidade do produto final (Jouve, 1994).

I.6.5. Critérios Microbiológicos aplicáveis aos alimentos.

A criação e aplicação de critérios microbiológicos para os alimentos é da responsabilidade de entidades internacionais, nomeadamente, a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Comissão Internacional sobre as Especificações Microbiológicas dos Alimentos (ICMSF) e a Comissão dos Codex Alimentarius (Roberts e Greenwood, 2003). Estes critérios têm como objetivo, proteger a saúde do consumidor, fornecendo produtos seguros, saudáveis e que satisfazem os requisitos de boas práticas de comércio, garantindo que os organismos indesejados são eliminados (Roberts e Greenwood, 2003).

Os critérios microbiológicos podem ser classificados em:

- ✓ Padrões microbiológicos; critérios obrigatórios, incluídos na legislação ou regulamentação e cujo não cumprimento pode resultar num processo judicial (Roberts e Greenwood, 2003).
- ✓ Especificações microbiológicas; no geral são acordos contratuais entre o fabricante e o comprador, de modo a verificar que os alimentos têm a qualidade exigida (Roberts e Greenwood, 2003).
- ✓ Diretrizes microbiológicas; são critérios não-obrigatórios, geralmente destinam-se a orientar os fabricantes e ajudar a garantir boas práticas de higiene (Roberts e Greenwood, 2003).

Recentemente a Organização Mundial para Saúde (OMS) publicou valores de referência (Tabela 2) para a interpretação de resultados obtidos a partir de uma análise microbiológica de vários alimentos, nomeadamente, carnes (suína, bovina e aves), alimentos marinhos (peixe, crustáceos, moluscos, etc.), vegetais, alimentos fermentados, alimentos processados prontos a comer, etc. (Roberts e Greenwood, 2003).

Tabela 2: Norma da Organização Mundial de Saúde para a Qualidade Microbiológica de vários alimentos prontos a comer

Food category (see Table 2.2)	Criterion	Microbiological quality (cfu/g unless stated)			Unacceptable/potentially hazardous
		Satisfactory	Acceptable	Unsatisfactory	
Aerobic colony count* 30°C/4 h					
1		<10 ³	10 ³ –<10 ⁴	≥10 ⁴	N/A†**
2		<10 ⁴	10 ⁴ –<10 ⁵	≥10 ⁵	N/A**
3		<10 ⁵	10 ⁵ –<10 ⁶	≥10 ⁶	N/A**
4		<10 ⁶	10 ⁶ –<10 ⁷	≥10 ⁷	N/A**
5		N/A	N/A	N/A	N/A**
Indicator organisms††					
1–5	Enterobacteriaceae‡	<100	100–<10 ⁴	≥10 ⁴	N/A**
1–5	<i>Escherichia coli</i> (total)	<20	20–<100	≥100	N/A**
1–5	<i>Listeria</i> spp. (total)	<20	20–<100	≥100	N/A**
Pathogens					
1–5	<i>Salmonella</i> spp.	ND			D
1–5	<i>Campylobacter</i> spp.	ND			D
1–5	<i>E. coli</i> O157 & other VTEC	ND			D
1–5	<i>Vibrio cholerae</i>	ND			D
1–5	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> §	<20	20–<100	100–<10 ³	≥10 ³
1–5	<i>Listeria monocytogenes</i>	<20¶	20–<100	N/A	≥100
1–5	<i>Staphylococcus aureus</i>	<20	20–<100	100–<10 ⁴	≥10 ⁴
1–5	<i>Clostridium perfringens</i>	<20	20–<100	100–<10 ⁴	≥10 ⁴
1–5	<i>Bacillus cereus</i> and other pathogenic <i>Bacillus</i> spp.	<10 ³	10 ³ –<10 ⁴	10 ⁴ –<10 ⁵	≥10 ⁵

cfu, colony forming units; VTEC, verocytotoxin producing *E. coli*. D, detected in 25 g; ND, not detected in 25 g.

*Guidelines for aerobic colony counts may not apply to certain fermented foods, e.g. salami, soft cheese and unpasteurized yoghurt. These foods fall into Category 5. Acceptability is based on appearance, smell, texture and the levels or absence of indicator organisms or pathogens.

†N/A denotes not applicable.

‡Not applicable to fresh fruit, vegetables and salad vegetables.

§Relevant to seafoods only.

¶If the *Bacillus* counts exceed 10⁴ cfu/g, the organism should be identified.

¶¶Not detected in 25 g for certain long shelf-life products under refrigeration.

**Prosecution based solely on high colony counts and/or indicator organisms in the absence of other criteria of unacceptability is unlikely to be successful.

††On occasions some strains may be pathogenic.

Fonte: Instituto Nacional Ricardo Jorge

Legenda:

1 – Arenque; Conservas de pescado cru

3 – Crustáceos; Refeições de pescado cru

4 – Moluscos; Peixe fumado

Capítulo II

Trabalho Experimental

II.1. Introdução e objectivos

O consumo de pratos preparados à base de pescado cru tem vindo a aumentar nos últimos anos em Portugal, devido em grande parte à recente popularidade de pratos tradicionais japoneses como o *Sushi* e *Sashimi*.

O pescado fresco é um alimento facilmente perecível, sendo a microbiota deteriorativa mais frequentemente encontrada *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, bolores e leveduras, entre outros. Pode ainda constituir um importante veículo de microrganismos patogénicos para o ser humano. Sabe-se que a contaminação por manipulação e processamentos inadequados ou mesmo utilização de equipamentos e utensílios contaminados são fatores importantes como veículos destes microrganismos (Muratori, 2000).

Uma vez que neste tipo de refeições o pescado não sofre tratamento térmico antes do consumo, considera-se de particular importância obter informações detalhadas sobre a microbiota deteriorativa e patogénica presente em *Sashimi*.

Os objetivos deste trabalho são:

- ✓ Caracterização da microbiota deteriorativa e patogénica em refeições de *Sashimi* adquiridas em restaurantes tradicionais japoneses no norte do país;
- ✓ Avaliação das práticas de preparação e conservação do pescado cru e dos conhecimentos sobre o sistema HACCP através da realização de inquéritos aos responsáveis dos estabelecimentos.

Com esta abordagem pretendeu-se tirar ilações sobre a qualidade e segurança microbiológica do pescado cru, para que seja possível em trabalhos posteriores definir eventuais intervenções estratégicas no sentido de salvaguardar a qualidade e segurança do produto, apenas possível conhecendo o seu contexto microbiológico.

II.2. Material e métodos

II.2.1. Amostragem

As amostras do produto em estudo foram obtidas diretamente em restaurantes japoneses da região norte, pertencentes aos distritos de Braga, Porto, Vila Real e Aveiro. Os restaurantes usados na recolha de amostras foram classificados em dois tipos de estabelecimento:

- ✓ 1 - Restaurantes de especialidade
- ✓ 2- Restaurantes de não especialidade

As refeições colhidas foram predominantemente salmão e atum, excepto quando não havia ou a quantidade não era suficiente, nesse caso recolheu-se diferentes espécies tais como robalo, rodovalho, dourada, peixe manteiga e vieira. Foram analisadas lascas de pescado cru pronto a consumir, analisando-se duas a três amostras por restaurante. As datas de colheita pretenderam abranger a época de Outono e Inverno, de Outubro a Fevereiro, com o objectivo das características do produto não se alterarem com a temperatura. A realização dos questionários para avaliação de conhecimentos e práticas de funcionários deste tipo de restaurantes foi realizada via telefone, excepto quando não era possível e aí os questionários eram feitos no local do estabelecimento.

II.2.2. Determinações efetuadas

No total foram realizadas determinações microbiológicas e físico-químicas de 61 (sessenta e uma amostras) refeições de *Sashimi* obtidas em 23 restaurantes em sistema de take-away.

As determinações microbiológicas englobaram a quantificação e/ou pesquisa de microrganismos patogénicos e deteriorativos.

- ✓ Os grupos microbianos quantificados foram:
 - ✓ *Microrganismos mesófilos totais*
 - ✓ *Microrganismos psicotróficos*
 - ✓ *Enterobacteriaceae*
 - ✓ *Bactérias do ácido láctico*

- ✓ *Fungos*
- ✓ Os microrganismos patogénicos quantificados e/ou pesquisados foram:
 - ✓ *Clostridium perfringens*
 - ✓ *Clostridium* spp.
 - ✓ *Staphylococcus aureus*
 - ✓ *Salmonella* spp.
 - ✓ *Listeria* spp.
 - ✓ *Escherichia coli*
 - ✓ *Bacillus cereus*
 - ✓ *Shewanella putrefaciens*
 - ✓ *Photobacterium phosphoreum*
 - ✓ *Vibrio* spp.

As determinações físico-químicas efetuadas foram as seguintes:

- ✓ pH
- ✓ Azoto base volátil total

II.2.3. Determinações físico-químicas

II.2.3.1. pH e ABVT

O pH foi determinado com um medidor de pH crison modelo micropH 2002, em 3 porta amostras, dois com 5g de amostra e um com 25g, para confirmação bioquímica e ABVT respectivamente.

A determinação do ABVT foi realizada pelo método de microdifusão de Conway, de acordo com a Norma Portuguesa 2930 de 1985. A técnica consistiu na pesagem de 25 g de amostra e homogeneizou-se com 50ml de TCA (Ácido Tricloroacético) a 10%, durante 1 minuto, num homogeneizador Polytron PT-MR 3000 (Kinematica AG), e filtrou-se por papel de filtro Whatman n.º 1. Para o lado direito de placa de Conway mediu-se 1 ml de água destilada e 1 ml de extrato. Para a coroa central das células de Conway, mediu-se 1 ml de uma solução de ácido bórico a 1%, e para o lado esquerdo da célula mediu-se 1ml de carbonato de potássio. As células foram cobertas com uma placa de vidro e incubadas numa estufa a 40°C durante 90 minutos. Após o tempo de incubação titulou-se o ácido bórico com ácido clorídrico a 0,02N

até ao primeiro mudar de cor para rosa, fez-se também um ensaio em branco com água e um com sulfato de amónio a 0,1% para determinação do coeficiente de difusão.

II.2.4. Determinações microbiológicas

II.2.4.1. Preparação da amostra

Procedeu-se à colheita e pesagem asséptica de 10 g de amostra, a qual foi diluída numa solução de 90 ml de NaCl (0,9 %). A amostra foi homogeneizada num “stomacher” durante 30 segundos e foram realizadas diluições decimais sucessivas em 9 ml da mesma solução. As diluições efetuadas foram utilizadas na contagem de microrganismos mesófilos totais; psicotróficos; *Enterobacteriaceae*; BAL; *Pseudomonas* spp.; *Shewanella putrefaciens*; *Photobacterium phosphoreum*; Coliformes totais; *Staphylococcus aureus*; *E. coli*; *Clostridium* spp.; *Clostridium perfringens*; *Bacillus cereus*; bolores e leveduras.

Os resultados foram expressos em ufc por grama de produto, calculados de acordo com as normas.

Efectuou-se a colheita e pesagem asséptica de 3 alíquotas de 25 g de amostra para pesquisa de *Salmonella* spp., *Listeria* spp., e *Vibrio* spp.

O procedimento realizado para cada microrganismo é descrito de seguida.

II.2.5. Microrganismos quantificados

II.2.5.1. Microrganismos mesófilos totais e psicotróficos

A contagem de microrganismos mesófilos totais e psicotróficos foi feita por incorporação de 1 ml da solução mãe e das respetivas diluições em meio de cultura seletivo PCA (Plate Count Agar) (Oxoid CM325). Após incubação a 30°C durante 72h para os microrganismos mesófilos (ISO 4833 de 1991) e 6,5 ± 0,5°C durante 10 dias para os microrganismos psicotróficos

(Norma Portuguesa 2307 de 1987), foram contadas as colónias e os resultados expressos em unidades formadoras de colónias por grama de produto (ufc/g).

II.2.5.2. *Enterobacteriaceae*

A contagem de *Enterobacteriaceae* foi feita pela técnica de contagem de colónias em meio VRBG agar (Violet Red Bile Glucose) (Biokar 011HA), por incorporação, em dupla camada, de 1 ml da solução mãe e das respectivas diluições. As placas foram incubadas a 35-37°C durante 24 ± 2h. Foi efectuada a contagem de colónias típicas (de cor rosa a vermelho, com ou sem halos de precipitação, ou colónias mucóides sem cor definida) das quais foi feita a confirmação bioquímica de 5 colónias típicas por placa contável. Foram repicadas para agar nutritivo e incubadas a 30°C durante 24h, sendo posteriormente sujeitas a confirmação bioquímica pela prova da oxidase (negativa) e capacidade de fermentação da glucose em meio Glucose Agar (Anexo A.1.). Após contagem das colónias, e, em função dos testes de confirmação bioquímica, os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama de produto (ufc/g) de acordo com a Norma ISO 5552 de 1997.

II.2.5.3. Bactérias do Ácido Lático

A contagem de *BAL* foi feita por incorporação de 1 ml da solução mãe e das respectivas diluições em meio de cultura seletivo MRS agar (Man Rogosa Sharpe) (Oxoid CM361) por dupla camada. Após incubação a 30°C durante 72 ± 3h, foram contadas as colónias e os resultados expressos em unidades formadoras de colónias por grama de produto (ufc/g) segundo a Norma de francesa V 04-503 de 1988.

II.2.5.4. *Pseudomonas* spp.

A contagem de *Pseudomonas* foi feita por incorporação de 1 ml de solução mãe e das respectivas diluições em meio de cultura seletivo CFC (Cetrimide, Fucidin, Cephaloridine) (Biokar BK 118HA). Após incubação a 30°C durante 48h contaram-se as colónias típicas e repicaram-se 5 para agar nutritivo e incubadas a 30°C durante 24h sendo depois sujeitas a confirmação bioquímica pela prova de oxidase (positiva) em que a coloração de roxo fica mais intensificada e pela multiplicação em aerobiose em meio Kligler Iron Agar (Oxoid CM0033). Após contagem das colónias, e, em função dos testes de confirmação bioquímica,

os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama de produto (ufc/g) conforme a Norma Francesa V04- 504 de 1998.

II.2.5.5. *Shewanella putrefaciens*

A contagem de *Shewanella putrefaciens* foi efetuada em Lyngby Iron agar (Anexo A.2) por Corbo. M.R., *et al* (2008) incorporação de 1ml de cada diluição decimal. Após incubação a 25°C durante 72h. Foi feita a confirmação bioquímica de 5 colónias típicas. A confirmação bioquímica dos isolados selecionados foi efetuada por pesquisa da enzima oxidase e congelamento em BHI. Após contagem das colónias, e, em função dos testes de confirmação bioquímica, os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama de produto (ufc/g).

II.2.5.6. *Photobacterium phosphoreum*

A contagem de *Photobacterium phosphoreum* foi efetuada em Lyngby Iron agar (Anexo A.2) segundo Corbo. M.R., *et al* (2008) por incorporação de 1ml de cada diluição decimal. Após incubação a 7°C durante 7 dias, foram contadas as colónias por luminescência em quarto escuro, os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama de produto (ufc/g).

II.2.5.7. Coliformes totais

A contagem de Coliformes totais foi feita por sementeira em incorporação de 1 ml da solução mãe e das respetivas diluições em meio de cultura VRBL agar (Violet Red Bile Lactose) (LiofilChem Ref 610058). Após incubação a 30°C durante 24h, foram contadas as colónias típicas de coloração púrpura e os resultados expressos em unidades formadoras de colónias por grama de produto (ufc/g) de acordo com a Norma Portuguesa 3788 de 1990.

II.2.5.8. Bolores e Leveduras

A contagem de bolores e leveduras foi feita por superfície de 0,1 ml da solução mãe e das respetivas diluições em meio de cultura seletivo CGA (Chloramphenicol Glucose Agar) (Biokar BK007HA). Após incubação a 25°C durante 3 a 5 dias, foram contadas as colónias de bolores e leveduras e os resultados expressos em unidades formadoras de colónias por grama de produto (ufc/g) de acordo com a ISO 13681 de 1995.

II.2.6. Microrganismos patogénicos quantificados e/ou pesquisados

II.2.6.1. Pesquisa e contagem de *Clostridium perfringens*

A contagem de *Clostridium perfringens* foi efetuada por sementeira de 1 ml da solução mãe e das respetivas diluições em meio de cultura seletiva de TSC (Tryptose Sulfite Cycloserine Agar) (Merck 11972), com adição do aditivo D-Cyclocerina, por incorporação, em dupla camada. As placas semeadas foram incubadas em condições de anaerobiose durante 20h a 35-37°C. Foram contadas as colónias (colónias negras) e feita a confirmação bioquímica de 5 colónias de cada placa contável por repicagem por picada central em meio de cultura de nitrato-mobilidade incubadas a 37°C durante 18 a 24h. Após examinar o tipo de crescimento ao longo da sementeira, adicionou-se a cada tubo 2 gotas de cada um dos reagentes Nit 1 (ácido sulfanílico+ácido acético) e Nit2 (N-N-dimetil- α -naftilamina+ácido acético), para pesquisa de Nitratos. Em meio de cultura lactosado com gelatina, incubado a 37 °C por 24 horas, observou-se a formação de gás e o aparecimento de uma coloração amarela. Em seguida arrefeceram-se os tubos a 5°C durante 1 hora e verificou-se a liquefação da gelatina. Em função da confirmação bioquímica, os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama de produto (ufc/g).

II.2.6.2. Pesquisa de *Clostridium* spp.

A pesquisa de *Clostridium* spp foi efetuada em meio de VL (S) e VL (2X) (Viande Levure) (Anexo A 3), com adição de Sulfito de Sódio e de Ferro Amoniacal, por incorporação de 1ml e de 10ml respetivamente de cada diluição decimal. Os tubos foram aquecidos durante 80°C durante 10 minutos seguido de arrefecimento rápido e incubados a 37°C durante 1 a 5 dias. Foi confirmada a presença através do enegrecimento do meio (Norma Portuguesa 2262 de 1986).

II.2.6.3. Pesquisa e contagem de *Staphylococcus aureus*

A contagem de *Staphylococcus aureus* foi efetuada por sementeira em superfície de 0,1 ml da solução mãe e das respetivas diluições em meio BP (Baird Parker) (Biolab BPA20500)

enriquecido com solução de gema de ovo, telurito (Difco 277910) e solução de sulfametazina (Anexo A.4.), numa concentração no meio completo de 5% e 2,5% respetivamente. Incubou-se a 37°C durante 48h. As colónias características (negras, convexas, brilhantes de diâmetro compreendido entre 5,0 e 2mm, rodeadas de um precipitado branco e de um halo transparente) foram posteriormente contadas. De cada placa contável foram repicadas cinco colónias típicas, repicadas para meio BHI (Oxoid CM1135), e após incubação a 37°C durante 24h, foram confirmadas quanto à morfologia, coloração de Gram e produção de coagulase utilizando plasma de coelho (BBL 240658).

Dada a possibilidade de existirem amostras nas quais não fosse possível fazer a contagem de colónias após diluição, foi efetuada a pesquisa de *Staphylococcus aureus* em 1 g de amostra recorrendo a procedimento de pré-enriquecimento de 10ml da solução mãe em 10 ml de meio de Chapman concentração dupla (Anexo A.5.). Após incubação a 37°C durante 48h, os procedimentos de isolamento foram efetuados por sementeira por esgotamento, em placas de BP (Baird Parker).

Os resultados calculados a partir da contagem de colónias efetuada e percentagem de colónias coagulase positiva, foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama de produto (ufc/g) (Norma Portuguesa 4400-1 de 1992).

II.2.6.4. Pesquisa de *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi efetuada através da colheita e pesagem asséptica de 25g de amostra para 225 ml de APT (água peptonada tamponada) (Biokar BH018HA) como um pré-enriquecimento, incubada a 37°C durante 16 a 24h. A sementeira para o enriquecimento foi realizado pela transferência de 0,1 ml da amostra de pré-enriquecimento em 10 ml de caldo Muller Kauffmann tetrathionate-novobiocin broth (MKT) (LiofilChem 610035) e para caldo Rappaport Vassiliadis Broth with soya (RVS) (Oxoid CM669) incubados a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ e $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ respetivamente, durante 24h. Posteriormente e após terem passado as 24h de incubação foram isoladas com ansas estéreis as anteriores culturas por sementeira em dois meios seletivos, xylose lysine deoxycholate agar (XLD) (LiofilChem 610060) e Hektoen Enteric Agar (HKT) (LiofilChem 610021), para desta forma obter colónias isoladas incubadas durante 24h a 37°C. Procedeu-se à contagem de colónias típicas de *Salmonella* spp. crescidas em XLD e HKT (colónias vermelhas com um centro preto devido à mudança de cor do

indicador). Para confirmação bioquímica, foram repicadas 5 colónias isoladas características em Agar Nutritivo, e incubação a 37°C durante 24 horas, as quais foram posteriormente repicadas por picada central em TSI agar (Oxoid CM6277) e Ureia.

O caldo ureia foi a incubar a 35°C durante 48 horas. O meio possui coloração vermelho-alaranjado clara. Para um resultado negativo, obtém-se uma mudança de cor para meio amarelado.

O meio TSI foi a incubar a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 ± 3 horas. As culturas típicas de *Salmonella* apresentaram a cunha alcalina (vermelha) e o fundo ácido (amarelo) com formação de gás e, em cerca de 90% formação de H₂S (escurecimento do agar). Esta determinação foi efetuada de acordo com a ISO 6579 de 2002.

II.2.6.5. Pesquisa e contagem de *Listeria* spp.

A pesquisa de *Listeria* spp. foi efetuada através de pré-enriquecimento de 25g de amostra do alimento em 225 ml de UVM I (“University of Vermont Medium”, modificado) (LiofilChem 610031), incubado a 30°C durante 24h, sendo o procedimento de enriquecimento efetuado após se pipetar 0,1 ml para 10 ml de UVM II (LiofilChem 610045) incubado a 30°C durante 24h. Após incubação fez-se a contagem e repicaram-se para placas de Oxford (Biokar BK110HA) durante 24h a 30°C. Após incubação em Oxford, repicaram-se 5 colónias típicas (rodeadas por um halo negro e centro negro em depressão, com um diâmetro de 2 mm) com uma ansa para placas de TSA-YE (Anexo.A.12.), incubadas a 37°C durante 24 horas. Fez-se incidir, nas placas de TSA-YE, uma luz transmitida obliquamente, a 45°C – Método de transiluminação de Henry e consideraram-se suspeitas de *Listeria* spp. todas as placas cujas colónias apresentaram uma tonalidade azul-esverdeada. Nestas procedeu-se à coloração de Gram, à pesquisa de catalase e oxidase, e a preparação a fresco.

Consideraram-se todas as colónias Gram positivas, catalase positivas, oxidase negativas, e que exibam mobilidade em “cambalhota”. Repicaram-se para BHI e incubaram-se a 37 °C durante 24 horas.

Para confirmação bioquímica realizaram-se testes de caldo de açúcares, mobilidade em meio semissólido e pesquisa de hemolisinas.

Para os testes de fermentação dos açúcares foi efetuada sementeira a partir do crescimento em BHI (Oxoid CM1135), nos dois caldos para utilização de hidratos de carbono, contendo 0,5% de L-ramenose e D-xilose respetivamente e incubação durante 24 a 48h a 37°C. Consideram-se positivos os tubos em que ocorreu uma viragem da cor do meio de púrpura para amarelo. Os resultados para *Listeria* devem ser Ramenose (+) e Xilose (-).

A pesquisa de hemolisinas foi realizada através de sementeira por esgotamento a partir do crescimento em BHI (Oxoid CM1135), em placa de gelose de sangue adicionada de 7% de sangue de carneiro desfibrilhado e estéril e realizada a incubação a 37°C durante 24 a 48 horas. Observaram-se zonas de β -hemólise. A positividade da reação traduz-se pela visualização de um fluido homogéneo, opaco com coloração vermelho-castanho, resultante da hemólise dos eritrócitos.

Esta determinação foi efetuada de acordo com a ISO 11290-1 de 1998.

II.2.6.6. Isolamento e Contagem de *Escherichia coli*

A contagem de *Escherichia coli* foi feita por incorporação de 1 ml da solução mãe e das respetivas diluições em meio de cultura seletivo TBX (Tryptone Bile Glucuronic Agar) (Biokar BK146HA). Após incubação a 41,5°C durante 18 a 24h, foram contadas as colónias características que apresentam uma coloração azul ou verde-azulada, os resultados expressos em unidades formadoras de colónias por grama de produto (ufc/g) (ISO 16649-2 de 2001).

II.2.6.7. Pesquisa de *Bacillus cereus*

A contagem de *Bacillus cereus* foi efetuada em meio Manitol Egg Yolk Polimixina agar (MYP) (LiofilChem 610114) ou (Anexo A.6) por sementeira em superfície de 0,1ml de cada diluição decimal. Após incubação a 30°C durante 24h. Nas amostras onde se observaram colónias típicas, colónias de coloração rosa com um precipitado á volta foram repicadas 5 colónias suspeitas por placa e transferidas para Agar Nutritivo (Merck 105450) durante 24h e depois para BHI (Oxoid CM1135) para posterior confirmação bioquímica através de placas em meio Columbia com 5% Sangue de carneiro onde se verifica hemólise à volta das colónias que são características. Os resultados expressos em unidades formadoras de colónias por grama de produto (ufc/g) (ISO 7932 de 2004).

II.2.6.8. Pesquisa e Contagem de *Vibrio* spp.

A pesquisa de *Vibrio* spp. foi efetuada através da metodologia do Laboratório do Exército Português com base na ISO 21872-1 de 2007. Foi preparado o meio de pré-enriquecimento em ASPW (Anexo A.7.), incubado a 37°C durante 24h. Posteriormente foram isoladas por sementeira em superfície em placas de TCBS (LiofilChem 611010.) e TSAT (Anexo.8.) durante 24h a 37°C. As colónias suspeitas apresentam uma coloração verde e/ou amarela e vermelha respetivamente. Foram repicadas 5 colónias características de cada placa para confirmação bioquímica através da pesquisa da enzima oxidase, TSI salino (Anexo.9.), mobilidade e Gram. Para contagem e antes dos meios de pré-enriquecimento serem incubados, efetua-se a sementeira por superfície de 0,2ml em placas de TCBS que foram colocadas a 37°C durante 24h. Após contagem foram isoladas 5 colónias características para confirmação bioquímica em Agar Nutritivo Salino (Anexo.A.10.). Foi feito um teste bioquímico em O/F Medium (Anexo.A.11.) e só aos positivos se fez o teste APi 20E. Os resultados expressos em unidades formadoras de colónias por grama de produto (ufc/g).

II.2.7. Inquéritos

A recolha de dados foi realizada ao longo do mês de Maio de 2013, através da realização de um questionário para avaliação de conhecimentos, forma de preparação de pratos tradicionais japoneses e sobre boas práticas nos 23 (vinte e três) restaurantes em estudo.

Os questionários de recolha de informações foram aplicados em visitas aos restaurantes ou através de telefonema durante o período laboral e consta em anexo (Anexo B.1.).

O questionário elaborado é composto por VIII grupos, que incluem questões gerais referentes aos aspectos sociodemográficos (idade e formação profissional), e questões relacionadas com as boas práticas de higiene, tipos de pratos preparados, tempo de descongelação médio, vantagens e desvantagens da utilização de pescado fresco e por fim o sistema HACCP.

O tipo de respostas apresentadas foi: sim, não, nomes de pratos, valores específicos, expressões e não sei/não respondo, esta ultima foi introduzida no questionário para reduzir o número de respostas dadas ao acaso para que estas não possam ser consideradas como corretas. Existem ainda respostas de escolha múltipla facilitando a resposta.

As respostas foram expressas em percentagens.

II.2.8. Análise de dados

Os dados recolhidos, após codificação e informatização foram analisados no programa *SPSS® Statistics* versão 20.0.0, para Microsoft Windows®.

Na avaliação das diferentes espécies de pescado, empregou-se uma estatística descritiva com média e desvio padrão, relativamente aos seus teores microbiológicos. Também se realizou o teste de correlação de Pearson para as diferentes variáveis em estudo. Considerou-se efeito não significativo (ns) quando $p \geq 0,05$; efeito significativo para $p < 0,05$; efeito muito significativo para $p < 0,01$ e efeito altamente significativo para $p < 0,001$.

Para o tratamento estatístico dos inquéritos foi realizado inicialmente a análise descritiva com a recolha de informação univariada para cada questão.

Capítulo III

Resultados e Discussão

III. Resultados e discussão

Apresentam-se de seguida os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas realizadas neste estudo e ainda os resultados obtidos nos inquéritos.

III.1. pH e ABVT

Segundo Huss (1997), o azoto nos alimentos encontra-se principalmente na forma de proteínas, as quais por ação das enzimas do próprio alimento ou de microrganismos são hidrolisadas, originando compostos sucessivamente mais simples: proteínas, polipéptidos, péptidos e por fim aminoácidos. Este autor refere ainda que da decomposição anaeróbica das proteínas e de compostos resultantes da sua hidrólise, os produtos finais podem ser completamente oxidados, dando origem a compostos com aromas desagradáveis tais como o sulfureto de hidrogénio, amónia, aminas (histidina, tiramina, piperidina, putrescina e a cadaverina) e indol, sendo estes compostos característicos da decomposição do alimento. É, desta forma, o conjunto do amoníaco e das aminas voláteis que é doseado na determinação do ABVT, sendo este um índice de frescura dos alimentos (Huss, 1997).

Os valores médios de pH e ABVT obtidos para as oito variedades de pescado analisados são mostrados na tabela 3.

Tabela 3 : Valores de pH e ABVT (média \pm desvio padrão), de acordo com o tipo de pescado.

	pH			ABVT	
	N	Média	\pm Dp	Média	\pm Dp
Salmão	27	6,08	0,17	18,24	5,21
Atum	14	5,86	0,22	16,97	3,83
Robalo	10	6,10	0,30	15,86	2,99
Rodvalho	1	5,72	-	14,73	-
Dourada	2	5,79	0,10	9,57	5,81
Peixe manteiga	5	5,86	0,17	12,10	1,10
Vieira	1	6,18	-	14,41	-
Pregado	1	6,28	-	17,22	-
Média Final	-	5,98	0,19	14,89	18,94

Pela análise da tabela 3 pode verificar-se que o valor de pH independentemente do tipo de pescado não sofre grandes variações, não se tendo observado diferenças significativas nos

valores médios entre espécies. Os valores de pH das amostras de pescado cru variam na faixa de 5,72-6,28, demonstrando um carácter mais ácido das mesmas.

Segundo um estudo realizado por Conde (1975), o pH do pescado fresco varia entre 6,6 e 6,8 e à medida que esse se deteriora os valores de pH aumentam e podem atingir 7,2. Também Oehlenschläger e Sörensen (1997) referem que o pH de um peixe fresco é inferior a 7.

Desta forma, podemos concluir que os valores médios de pH das amostras analisadas encontravam-se muito abaixo dos limites máximos considerados aceitáveis para peixe fresco, logo dando indicação de um bom estado de frescura.

Relativamente ao ABVT, como mencionado no Regulamento (CE) nº 2074/2005 da Comissão de 5 de Dezembro de 2005 e segundo Baixas-Nogueras *et al.* (2002), o valor a partir do qual se consideraria que as amostras das espécies estudadas estariam impróprias para consumo é de 35 mgN/100g.

Através da análise da tabela 4, pode verificar-se que os valores médios de ABVT de todas as amostras dos diferentes tipos de pescado analisadas encontram-se abaixo do limite permitido por lei, variando numa faixa de 9,57 a 18,24, demonstrando um carácter de frescura das amostras, logo aptas para consumo de acordo com este índice.

Em Portugal, foi realizado um estudo por Fontes *et al.* (2007) que analisaram vinte e três amostras de pescado fresco imediatamente após a aquisição, sendo que, entre outras análises, determinaram o teor de ABVT. Nesse estudo foram obtidos valores de ABVT, com um teor médio de 27,36 mgN/100g, máximo de 33,77 mgN/100g e mínimo de 11,92 mgN/100g. Através dos dados apresentados na tabela 3, observa-se que os valores obtidos para o teor de ABVT para as amostras analisadas no nosso estudo estão dentro dos valores determinados por Fontes *et al.* (2007), sendo contudo inferiores em média. Os valores Detetados pelos autores nas amostras estudadas também apresentaram valores inferiores ao limite considerado pela legislação.

III.2. Avaliação Microbiológica

Por forma a avaliarmos a qualidade higiénica das refeições de *Sashimi* fornecidas nos restaurantes tradicionais japoneses foram usados os valores guia estabelecidos por Santos *et al.* (2005) e por Gilbert *et al.* (2000). Na tabela 4 apresentam-se os valores guia para a

avaliação microbiológica de amostras de *Sashimi* em diferentes categorias, de acordo com os teores de microrganismos.

Tabela 4 : Valores guia para a avaliação microbiológica de amostras de *Sashimi*.

	Classificação				Fonte
	Satisfatório	Aceitável	Insatisfatório	Inaceitável	
INDICADORES					
Mesófilos	≤ 3 log	> 3 log a ≤ 5 log	> 5 log	N/A	a
Psicotróficos	≤ 3 log	> 3 log a ≤ 5 log	> 5 log	N/A	a
<i>Enterobacteriaceae</i>	< 2 log	≥ 2 log a < 4 log	≥ 4 log	N/A	b
Bolores	≤ log	> log a ≤ 2 log	≥ 2 log	Caso a caso	a
Leveduras	≤ 2 log	> 2 log a ≤ 4 log	≥ 4 log	N/A	a
Coliformes Totais	≤ log	> log a ≤ 3 log	> 3 log	N/A	a
PATOGÉNICOS					
<i>Staphylococcus aureus</i>	≤ 2 log	N/A	≥ 2 log a ≤ 4 log	> 4 log	a
<i>Listeria spp.</i>	< 2 log	N/A	≥ 2 log	N/A	a
<i>Bacillus cereus</i>	≥ 2 log	> 2 log a ≤ 3 log	> 3 log a < 5 log	≥ 5 log	a
<i>Echerichia coli</i>	< log	N/A	≥ log	N/A	a
<i>Salmonella spp.</i>	Ausente em 25 gramas	Ausente em 25 gramas	-	-	a
<i>Clostridium perfringens</i>	< log	≥ log a ≤ 3 log	> 3 log a < 4 log	≥ 4 log	a

^a - Santos *et al.* (2005)

^b - Gilbert *et al.* (2000)

III.2.1. Microbiota deteriorativa

Os valores das contagens (média e desvio padrão) obtidas para a microbiota deteriorativa quantificada (Mesófilos, Psicotróficos, *Enterobacteriaceae*, BAL, *Pseudomonas* spp., *Shewanella putrefaciens*, Coliformes totais, Bolores e Leveduras) encontram-se descritos na tabela 5 de acordo com o tipo de pescado analisado (Salmão, Atum, Robalo, Rodovalho, Dourada, Peixe manteiga, Vieira e Pregado).

Tabela 5 : Valores de Média e Desvio Padrão para a Microbiota Deteriorativa, expressos em log (ufc/g), de acordo com o tipo de Pescado.

	N	Mesófilos		Psicotróficos		<i>Enterobacteriaceae</i>		BAL		<i>Pseudomonas</i> spp.		<i>Shewanella putrefaciens</i>		Coliformes totais		Bolores		Leveduras	
		Média	± Dp	Média	± Dp	Média	± Dp	Média	± Dp	Média	± Dp	Média	± Dp	Média	± Dp	Média	± Dp	Média	± Dp
Salmão	27	5,21	1,19	4,90	0,86	3,39	1,54	4,86	1,06	3,13	1,93	1,23	1,40	4,73	1,05	1,57	1,26	3,29	1,31
Atum	14	5,11	1,19	5,07	0,93	3,25	1,90	4,85	1,32	2,83	2,29	1,26	1,41	4,82	1,05	1,55	1,41	3,65	0,89
Robalo	10	4,85	1,12	4,94	1,43	3,33	1,64	4,64	1,00	3,10	1,67	1,89	1,65	4,78	1,42	1,31	1,48	3,71	0,85
Rodovalho	1	4,92	-	4,02	-	3,03	-	4,23	-	2,96	-	ND	-	4,01	-	ND	-	3,83	-
Dourada	2	4,74	0,14	5,79	0,18	3,44	1,17	4,89	0,18	3,09	2,01	2,11	2,11	4,52	1,02	1,00	1,00	3,52	0,38
Peixe manteiga	5	5,16	0,69	4,99	0,97	2,44	1,24	4,85	0,74	3,16	1,75	1,57	0,90	4,27	0,49	0,83	1,18	3,39	0,27
Vieira	1	4,73	-	5,14	-	4,27	-	4,21	-	ND	-	4,03	-	4,73	-	3,32	-	3,57	-
Pregado	1	5,68	-	5,63	-	3,03	-	6,06	-	4,88	-	2,28	-	3,93	-	ND	-	3,72	-
Média Final	-	5,05	0,87	5,06	0,87	3,27	1,50	4,82	0,86	3,31	1,93	2,05	1,49	4,47	1,01	1,60	1,26	3,58	0,74

ND - Não Detetado

Na contagem dos microrganismos mesófilos obteve-se um valor médio de 5,05 log (ufc/g), atingindo um valor máximo nas espécies Pregado, Salmão, Peixe Manteiga e Atum, sendo respectivamente 5,68 log (ufc/g), 5,21 log (ufc/g), 5,16 log (ufc/g) e 5,11 log (ufc/g). No entanto, no caso do Pregado, a espécie com o teor mais alto de mesófilos com 5,68 log (ufc/g), este valor é referente a apenas um exemplar da espécie.

Segundo Franco e Landgraf (2005), a quantificação de microrganismos mesófilos visa verificar a contaminação geral de um alimento e tem sido usada como indicador da qualidade higiênica dos alimentos, fornecendo também informação sobre o seu tempo de vida útil.

Relativamente aos valores obtidos, estes apresentaram-se coerentes com os valores esperados, segundo alguns estudos realizados por outros autores. Batista *et al.* (2001) registou contagens totais de mesófilos entre $8,9 \times 10^3$ e $3,5 \times 10^7$ ufc/g, em 515 exemplares de carapau. Os autores pretendiam, entre outros estudos, verificar a existência de uma relação entre o grau de frescura atribuído a um determinado produto da pesca e a contagem total de mesófilos, contudo esta não foi conseguida. Segundo os mesmos autores, apenas as contagens totais superiores a 7 log (ufc/g) são consideradas acima do valor máximo admissível para pescado fresco de acordo com a International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 1998). Segundo esta referência todos os exemplares estudados apresentaram valores admissíveis para a contagem de mesófilos totais.

Agnese *et al.* (2001), por exemplo, relata que valores de microrganismos mesófilos superiores a 6 log (ufc/g) no músculo de peixe são considerados críticos em relação ao grau de frescura. No entanto, Lira *et al.* (2001) observou que alguns pescados que apresentaram contagens superiores a 6 log (ufc/g) não apresentavam alterações nas suas características sensoriais, enquanto outros com teores inferiores, foram considerados inaceitáveis em termos sensoriais. Segundo Valle *et al.* (2000) a presença de mesófilos pode ser demonstrativa de indícios de más condições de armazenamento e má higiene na manipulação do pescado nas etapas compreendidas entre a captura e a exposição à venda.

Na contagem dos Psicotróficos o valor médio de contagens atinge 5,06 log (ufc/g), sendo que os valores médios mais elevados estão relacionados com as espécies Dourada, Pregado, Vieira, Atum e Peixe Manteiga, o mesmo acontece neste caso em relação à Vieira e ao Pregado, como foi apenas colhido para amostra um exemplar de cada, estes não apresentam valores tão representativos como as restantes espécies estudadas com 2 ou mais exemplares.

Num trabalho realizado por McCoy *et al.* (2010) em filetes de peixe-gato foram detetados teores de psicotróficos compreendidos entre 3,0 log (ufc/g) e 6,5 log (ufc/g). Comparando estes valores com os obtidos no presente trabalho, observa-se que os valores estão próximos dos encontrados por este autor. No entanto, segundo os valores guia de referência para alimentos prontos a comer elaborados por Santos *et al.* (2005), o limite máximo aceitável para

mesófilos e para psicotróficos é 5 log (ufc/g), assim sendo no caso dos mesófilos foram observados quatro casos em que esses limites foram ligeiramente ultrapassados, são eles o Salmão com contagens de 5,21 log (ufc/g), o Atum com 5,11 log (ufc/g), o Peixe-Manteiga com valores de contagens de 5,16 log (ufc/g) e o Pregado com um valor de 5,68 log (ufc/g). Para os psicotróficos foram observados também quatro casos em que os limites máximos foram ultrapassados, foram eles o Atum com contagens de 5,07 log (ufc/g), a Dourada com 5,79 log (ufc/g), a Vieira com valores de contagens de 5,14 log (ufc/g) e o Pregado com contagens de 5,63 log (ufc/g). Todos estes valores de mesófilos e de psicotróficos são não satisfatórios, ainda que na maioria dos casos estejam perto do valor limite de 5 log (ufc/g). Em média, os valores das 61 refeições de *Sashimi* analisadas estão dentro dos limites aceitáveis.

As contagens de *Enterobacteriaceae* apresentam um valor médio de 3,27 log (ufc/g), não existindo um valor médio de contagem que se destaque dos outros por ser elevado, pelo contrário existe o valor médio de 2,44 log (ufc/g) para o Peixe Manteiga que se destaca por ser o menor neste grupo de microrganismos.

Tendo por base as normas para a qualidade microbiológica dos alimentos prontos a comer de Gilbert *et al.* (2000), é possível verificar que as contagens microbianas de *Enterobacteriaceae*, na musculatura do pescado, devem ser inferiores a 2 log (ufc/g) aos 0 dias de armazenamento, indicando uma qualidade satisfatória para o consumo humano e boas práticas de manuseamento. O pescado apresenta padrões de qualidade não satisfatórios, quando as contagens de *Enterobacteriaceae* são superiores ou iguais a 4 log (ufc/g), tendo sido observado neste trabalho um caso com contagens de 4,27 log (ufc/g) correspondendo à amostra de Vieira, sendo este o único valor de *Enterobacteriaceae* não satisfatório.

As contagens das Bactérias do Ácido Lático (BAL) apresentam um valor médio de 4,82 log (ufc/g), o valor que se destaca é o determinado para o Pregado com 6,06 log (ufc/g), os restantes valores encontram-se entre 4,21 log (ufc/g) e 4,89 log (ufc/g).

As contagens de *Pseudomonas* spp. aportam um valor médio de 3,31 log (ufc/g), atingindo o valor mais elevado no Pregado e o mais baixo no Atum, sendo os valores 4,88 log (ufc/g) e 2,83 log (ufc/g) respetivamente. Na contagem de *Shewanella putrefaciens* obteve-se um valor médio de 2,05 log (ufc/g), existindo um único valor que se destaca por ser elevado,

relacionado com a espécie de pescado Vieira com um valor médio de contagem de 4,03 log (ufc/g).

Segundo Gram e Dalgaard (2002), em condições aeróbias *Pseudomonas* spp. são os microrganismos mais importantes na deterioração do pescado, enquanto que em condições com menos oxigénio os teores de *Shewanella putrefaciens* e de *Photobacterium phosphoreum* aumentam. Gram e Dalgaard. (2002) detetou entre níveis de 6 log (ufc/g) e 8 log (ufc/g) com produção de odores típicos de deterioração em Bacalhau. Como é possível verificar através da tabela 5 os valores de *Pseudomonas* spp. e de *Shewanella putrefaciens* são inferiores quando comparados aos encontrados por Gram e Dalgaard (2002).

Na contagem de Coliformes totais apresenta-se um valor médio de 4,47 log (ufc/g). Para este caso em específico e independentemente da espécie de pescado em estudo não se obtém um valor de destaque, estando todos entre 3,93 log (ufc/g) e 4,78 log (ufc/g), correspondendo às espécies Pregado e Rodovalho respectivamente.

As contagens de coliformes totais são um bom indicador de higiene dos alimentos. No estudo realizado por McCoy *et al.* (2010), o autor detetou valores de coliformes que variavam entre 0,8 log (ufc/g) e 3,2 log (ufc/g). Os valores obtidos neste trabalho estão ligeiramente acima dos encontrados por McCoy *et al.* (2010) e quando comparados com os valores guia estabelecidos por Santos *et al.*, (2005), encontram-se fora dos limites máximos estabelecidos, podendo-se classificar as amostras como não satisfatórias. Isto dá uma indicação de uma contaminação dos alimentos de natureza fecal, provavelmente provocada pelos manipuladores.

As contagens de Bolores aportam para um valor médio de 1,60 log (ufc/g), sendo que o valor médio de contagens mais elevado corresponde à Vieira com 3,32 log (ufc/g) e o mais baixo ao Peixe Manteiga com 3,32 log (ufc/g).

As contagens de Leveduras apresentam um valor médio de 3,58 log (ufc/g) e todos os valores para qualquer espécie apresentam-se dentro do mesmo padrão.

A elevada deteção de Bolores e Leveduras pode indicar-nos que houve uma inadequada manipulação do pescado podendo ter havido falhas na evisceração e lavagem do mesmo e também erradas temperaturas de refrigeração. Martins *et al.* (2002) realizou um estudo em

Tilápia em que foram encontrados valores de Bolores e de Leveduras na ordem dos $5,2 \times 10^3$ ufc/g.

Comparando os valores obtidos com os estabelecidos nos valores guia de referência de Santos *et al.* (2005) foi observado neste trabalho um caso para os Bolores com contagens de 3,32 log (ufc/g) para a Vieira que ultrapassa o limite máximo para aceitável. As contagens de Leveduras encontram-se dentro dos parâmetros para a categoria de aceitável, que está estabelecida entre 2 log (ufc/g) e 4 log (ufc/g).

III.2.2. Microbiota patogénica pesquisada

Na tabela 6 encontra-se (em 0,1g ou 1g) o número de casos de detecção de microrganismos patogénicos pesquisados (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Vibrio* spp.) para cada tipo de pescado analisado (Salmão, Atum, Robalo, Rodovalho, Dourada, Peixe manteiga, Vieira e Pregado).

Tabela 6 : Número de casos, Presença ou Ausência da Microbiota Patogénica para cada tipo de Pescado.

	N	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>Salmonella</i> spp.		<i>Listeria</i> spp.		<i>Bacillus cereus</i>		<i>Clostridium perfringens</i>		<i>Vibrio</i>		<i>Clostridium</i> spp.	
		1g	0,1g	1g	0,1g	1g	0,1g	1g	0,1g	1g	0,1g	1g	0,1g	1g	0,1g	1g	0,1g
Salmão	27	1	0	0	0	0	0	0	0	12	1	1	0	1	0	3	2
Atum	14	1	0	0	0	0	0	0	0	8	1	0	0	1	0	0	0
Robalo	10	1	0	0	0	0	0	0	0	9	1	0	0	1	0	2	1
Rodvalho	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Dourada	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Peixe manteiga	5	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	1	0	0	0
Vieira	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Pregado	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	61	4	0	0	0	0	0	0	0	34	3	1	0	4	0	6	3

0 - Ausência

Através da observação da tabela 6, é possível observar que na maioria dos casos os microrganismos só se detetaram quando se pesquisa em 1g de amostra. Em 8 microrganismos pesquisados foram Detetados *Staphylococcus aureus* em 4 amostras, *Bacillus cereus* em 34, *Vibrio* spp. em 4, *Clostridium* spp. em 6 e *Clostridium perfringens* em 1 amostra. *Bacillus cereus* (3 amostras) e *Clostridium* spp.(3 amostras) foram os únicos microrganismos Detetados em 0,1g de amostra. Pode observar-se que os microrganismos pesquisados foram detetados em várias espécies colhidas para amostra, com exceção do Pregado, no qual não foi detetado qualquer um dos microrganismos

pesquisados. As espécies em que se observaram uma maior contaminação foram o Salmão, Atum e Robalo e em menor proporção o Rodovalho, Dourada, Peixe manteiga e Vieira

III.2.3. Microbiota patogénica quantificada

Os valores das contagens (médias e desvio padrão) obtidas para a microbiota patogénica quantificada (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Vibrio* spp.) encontram-se descritos na tabela 7 de acordo com o tipo de pescado analisado (Salmão, Atum, Robalo, Rodovalho, Dourada, Peixe manteiga, Vieira e Pregado).

Tabela 7 : Valores de Média e de Desvio Padrão para a Microbiota Patogénica de acordo com o tipo de Pescado.

	N	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>Salmonella</i> spp.		<i>Listeria</i> spp.		<i>Bacillus cereus</i>		<i>Clostridium perfringens</i>		Vibrio	
		Média	± Dp	Média	± Dp	Média	± Dp	Média	± Dp	Média	± Dp	Média	± Dp	Média	± Dp
Salmão	27	0,99	1,16	ND	-	ND	-	ND	-	0,41	0,92	ND	-	0,04	0,19
Atum	14	1,12	1,18	ND	-	ND	-	0,07	0,26	0,58	0,95	ND	-	0,07	0,26
Robalo	10	1,73	1,23	ND	-	ND	-	ND	-	0,81	1,64	ND	-	0,10	0,30
Rodovalho	1	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
Dourada	2	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	1,32	1,32	ND	-	ND	-
Peixe manteiga	5	0,65	0,78	ND	-	ND	-	ND	-	0,36	0,71	ND	-	0,20	0,40
Vieira	1	3,39	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
Pregado	1	3,24	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
Média Final	-	1,85	4,35	-	-	-	-	0,07	0,26	0,69	5,55	-	-	0,10	1,15

ND - Não Detetado

Observando a tabela 7 e os valores nela apresentados percebe-se que a quantificação da microbiota patogénica não obteve valores muito elevados. No entanto, existem alguns valores que merecem ser referidos. Dos microrganismos estudados, o que se detectou mais frequentemente e com teores mais elevados foi *Staphylococcus aureus*.

As contagens de *Staphylococcus aureus* aportam um valor médio de 1,85 log (ufc/g), apresentando para a Vieira e para o Pregado valores médios de contagens de 3,39 log (ufc/g) e 3,24 log (ufc/g) respectivamente. O Peixe Manteiga apresenta o valor médio mais baixo com 0,65 log (ufc/g) e no Rodovalho e Dourada não se obtiveram contagens de *S. aureus*.

Os limites estabelecidos por Santos *et al.* (2005) são de 2 log (ufc/g), tendo sido observados neste trabalho dois casos em que esse limite foi ultrapassado com contagens de 3,39 log

(ufc/g) para a Vieira e de 3,24 log (ufc/g) para o Pregado, com estes valores podemos classificar estas duas refeições como não satisfatórias.

Staphylococcus aureus encontra no Homem o seu principal habitat, localizando-se na pele, mucosas nasais e trato respiratório. Segundo Martins *et al.* (2002), a presença de *Staphylococcus aureus* em níveis insatisfatórios podem ser indicativos de falta de higiene pessoal dos manipuladores do pescado, da utilização de equipamento contaminado ou de contaminação de fontes humanas ou animais e ainda um errado controlo da temperatura de refrigeração. Neste trabalho, no entanto não se pode estabelecer relação com uma errada manipulação ou más práticas de higiene.

Escherichia coli, *Salmonella* spp. e *Clostridium perfringens* não foram Detetados nas amostras analisadas.

Listeria spp. foram observadas no Atum com um valor médio de 0,07 log (ufc/g), não tendo sido contudo detetada *Listeria monocytogenes*. Santos *et al.* (2005) estabelece que o valor máximo de contagens para *Listeria* spp. é 2 log (ufc/g), assim sendo o único caso observado com contagens de 0,07 log (ufc/g) para o Atum, pode ser classificado como satisfatória.

Na contagem de *Bacillus cereus* apresenta-se um valor médio de 0,69 log (ufc/g). Todos os valores determinados são baixos, no entanto a Dourada consegue obter um valor médio de contagem de 1,32 log (ufc/g) e os restantes valores variam entre 0,36 log (ufc/g) e 0,81 log (ufc/g) correspondendo às espécies Peixe Manteiga e Robalo. Para o Rodovalho, a Vieira e o Pregado não existem valores médios de contagens daí estarem representados por ND (Não Detetado).

Fang *et al.* (2003) realizou um estudo em Taiwan em que os resultados obtidos variaram entre 199 ufc/g e $3,2 \times 10^3$ ufc/g. Neste estudo, os valores são inferiores aos Detetados por aquele autor, mas encontram-se dentro dos parâmetros satisfatórios segundo os valores guia de Santos *et al.* (2005) que estabelece como limite máximo entre 2 log (ufc/g) e 3 log (ufc/g).

As contagens de *Vibrio* spp. aportam um valor médio de 0,10 log (ufc/g), sendo que o valor mais elevado está relacionado com o Peixe Manteiga com 0,20 log (ufc/g) e o mais baixo com o Salmão com um valor médio de contagens de 0,04 log (ufc/g). Não houve multiplicação e daí não existir nenhum valor para o Rodovalho, a Dourada, a Vieira e o Pregado identificados com ND (Não Detetado).

Gram e Dalgaard (2002) realizaram um estudo em que detectaram *Vibrio* spp. com resultados de 2 log (ufc/g). Comparando com os valores obtidos neste estudo, estes são muito inferiores aos obtidos por Gram e Dalgaard (2002). Ao nível de valores guia de referência estabelecidos por Gilbert *et al.* (2000) só existem para *Vibrio parahaemolyticus* e para *Vibrio cholerae*. Nenhuma destas estirpes foram detetadas neste trabalho.

Foram encontradas quatro estirpes de Víbrios não patogénicos, são eles *Vibrio pelagius I* em Atum e Peixe manteiga, *Vibrio proteolyticus* em Salmão, *Vibrio mimicus* em Robalo e *Vibrio corarillilyticus* em Peixe manteiga.

III.3. Correlações e significâncias

Com o objectivo de avaliar a relação entre as variáveis em estudo foram determinadas as correlações de Pearson e avaliado o nível de significância. Na tabela 8 apresentam-se as correlações de Pearson e o nível de significância obtidos para todas as variáveis estudadas.

Tabela 8 : Correlações de Pearson (r) e valores de Significância para os parâmetros analisados.

	pH	ABVT	Mesófilos	Psicotróficos	Enterobacteriaceae	BAL	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Shewanella</i> <i>putrefaciens</i>	Coliformes totais	Bolores	Leveduras	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Bacillus</i> <i>cereus</i>	<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>
pH	1	-0,024	-0,018	0,039	0,048	0,003	0,122	0,029	0,077	0,024	0,063	0,441***	-0,075	.
ABVT	0,784	1	0,165	0,097	0,112	0,133	0,059	0,076	0,019	0,091	0,056	0,19	0,003	.
Mesófilos	0,842	0,063	1	0,373***	0,247**	0,535***	0,179*	0,014	0,344**	0,107	0,243	0,065	-0,069	.
Psicotróficos	0,654	0,273	0	1	0,340***	0,487***	0,106	0,086	0,522***	0,143	0,294*	0,153	-0,102	.
Enterobacteriaceae	0,588	0,21	0,005	0	1	0,274**	-0,139	-0,047	0,674***	0,435***	0,424***	0,292*	0,025	.
BAL	0,975	0,132	0	0	0,002	1	0,144	0,223	0,471***	0,066	0,324**	0,149	-0,131	.
<i>Pseudomonas</i> spp.	0,175	0,514	0,046	0,241	0,125	0,108	1	0,258*	0,05	-0,194	0,008	0,032	-0,125	.
<i>Shewanella putrefaciens</i>	0,825	0,559	0,916	0,51	0,721	0,084	0,044	1	0,155	0,095	-0,12	0,1	-0,252	.
Coliformes totais	0,557	0,559	0,007	0	0	0	0,669	0,232	1	0,369**	0,409***	0,308*	-0,09	.
Bolores	.	0,484	0,412	0,271	0	0,614	0,134	0,468	0,003	1	0,189	0,015	-0,067	.
Leveduras	0,629	0,668	0,06	0,022	0,001	0,01	0,952	0,358	0,001	0,144	1	-0,138	0,071	.
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0,142	0,618	0,241	0,022	0,25	0,804	0,444	0,016	0,91	0,29	1	-0,067	.
<i>Bacillus cereus</i>	0,563	0,985	0,599	0,436	0,845	0,313	0,338	0,052	0,489	0,606	0,588	0,606	1	.
<i>Clostridium perfringens</i>	1

***Correlação é significativa ao nível de 0,001 (2-Caudas).

** Correlação é significativa ao nível 0,01 (2-caudas).

* Correlação é significativa ao nível de 0,05 (2-caudas).

Das correlações de Pearson obtidas destaca-se uma correlação muito significativa entre BAL e Mesófilos ($r=0,535$; $p < 0,0001$). Segundo Lacasse (1995) os microrganismos mesófilos formam um grupo muito importante do ponto de vista sanitário, sendo responsáveis pela alteração dos alimentos armazenados a temperatura ambiente, as BAL são um exemplo deste tipo de bactérias. No procedimento de contagem proporciona-se a estas duas espécies as condições ideais de multiplicação, por este motivo era de se esperar que as Bactérias do Ácido Lático aumentassem consoante aumentavam os Mesófilos.

Observou-se uma correlação positiva e relativamente elevada ($r=0,674$; $p < 0,0001$), o que é justificável pois os Coliformes totais pertencem à família *Enterobacteriaceae*, logo se as últimas de multiplicam os coliformes também o conseguiram fazer, ou seja quanto maior for o número de *Enterobacteriaceae* maior será o de Coliformes totais.

Uma correlação suscitou alguma curiosidade foi a de *Staphylococcus aureus* e os valores de pH ($r=0,441$; $p < 0,0001$). Através de estudos realizados por Jay (2005) e também por Franco e Landgraf (2005) estes constataram que *Staphylococcus aureus* multiplica-se na faixa de pH de 4 a 9,8, com um valor óptimo que varia entre 6 e 7. Segundo Huss (1995) e Howgate (2009) o pH do pescado encontra-se no intervalo 6,1 e 6,5, estando nos valores óptimos para multiplicação de *Staphylococcus aureus*.

III.4. Avaliação higiénica das refeições de *Sashimi* de acordo com a espécie de Pescado

Na tabela 9 apresentam-se os resultados de avaliação higiénica das 61 refeições de *Sashimi* analisadas de acordo com a espécie de pescado e número de refeições analisadas. A avaliação higiénica é estabelecida de acordo os valores guia de teores microbianos em alimentos prontos a comer, já apresentados na tabela 5, sendo distribuída pelas seguintes categorias: Satisfatório, Aceitável, Insatisfatório e Inaceitável.

Os valores individuais das contagens para cada refeição de *Sashimi* apresentam-se discriminadas na tabela I em anexo II.

Tabela 9 : Avaliação higiênica de refeições de Sashimi de acordo com a espécie de pescado.

	Total	Satisfatório	Aceitável	Insatisfatório	Inaceitável
Salmão	27	0	9	18	0
Atum	14	0	4	10	0
Robalo	10	0	3	7	0
Peixe manteiga	5	0	4	1	0
Dourada	2	0	1	1	0
Vieira	1	0	0	1	0
Pregado	1	0	1	0	0
Rodvalho	1	0	0	1	0
Total	61	0	22 (36%)	39 (64%)	0

É possível observar através dos valores de contagens de microrganismos que 39 amostras, ou seja, 63,93% das amostras são classificadas como insatisfatórias e que apenas 22 amostras, ou seja, 36,07% são classificadas como aceitáveis. É de referir que nenhuma das amostras analisadas teve classificação de satisfatório.

Estes resultados permitiram verificar o estado sanitário das refeições de pescado cru estudadas, podendo considerar-se que existem deficiências em termos de higiene dos restaurantes onde se realizaram as recolhas para pesquisa.

III.5. Avaliação de conhecimentos e práticas de manipuladores de pratos tradicionais japoneses

De seguida apresentam-se os dados obtidos através de inquéritos realizados aos responsáveis de 23 (vinte e três) restaurantes, dos quais apenas de 16 (dezasseis) responderam. De acordo com os dados obtidos os funcionários dos 16 restaurantes estudados são no total 114 (cento e catorze).

Os resultados serão apresentados de acordo com a variável idade, onde será possível verificar qual ou quais as faixas etárias que mais se encontram a trabalhar nestes estabelecimentos; a variável formação que nos permitirá concluir se os trabalhadores são formados na área de hotelaria ou se o conhecimento que têm se deve à sua experiência profissional e a variável localidade, no Norte do país, contudo com esta questão consegue-se obter informação acerca da localização exacta e onde mais se concentram.

Efetuar-se-iam ainda questões mais práticas relacionadas com as características específicas deste tipo de culinária e restauração. Assim sendo, teremos variáveis como a origem (forma de obtenção) do pescado, ou seja, se os proprietários preferem pescado congelado em detrimento do fresco ou o contrário; uma questão relacionada com os dias de refrigeração em que mantém o pescado após obtenção (fresco e/ou congelado) e também com a utilização ou não de tábua de corte diferenciada para cada tipo de operação, desde a evisceração e lavagem do pescado até à preparação das peças para as refeições.

São também apresentadas questões sobre quais as vantagens e desvantagens da utilização de pescado fresco quando comparado com o pescado congelado.

Este tipo de culinária utiliza muito os vegetais não só como acompanhamento para a refeição mas também como ornamentação dos pratos, pelo que foi incluída a questão se esses vegetais utilizados são ou não desinfetados. E por fim a questão que, para certos inquiridos gerou alguma confusão, de qual seria o Ponto Crítico de Controlo no seu plano de HACCP.

III.5.1. Variável Idade e Formação

Na tabela 10 apresentam-se as características sociodemográficas dos funcionários dos 16 restaurantes (n=114), agrupados em 6 categorias de idade: 16 a 19 anos; 20 a 29; 30 a 39; 40 a 49; 50 a 59 e igual ou superior aos 60 anos. Na Tabela 11 apresentam-se ainda os dados referentes ao tipo de formação obtida para exercer esta atividade profissional: se foi através da experiência; da realização de curso de formação com mais de 50 horas; da realização de curso superior ou não sabe

Tabela 10 : Variável Idade e Formação

Variável em estudo		114 Funcionários (n%)
Idade	[16-19]	2 (1,75)
	[20-29]	56 (49,12)
	[30-39]	30 (26,32)
	[40-49]	20 (17,54)
	[50-59]	6 (5,26)
	[+60]	0
		16 Restaurantes (n%)
Formação	Experiência	11 (68,75)
	Experiência + Curso 50horas	2 (12,50)
	Experiência + Curso Superior	1 (6,25)
	Curso 50horas	1 (6,25)
	Não sabe	1 (6,25)

No total de 114 funcionários a idade varia entre os 16 e os 60 anos, sendo que 49,12% encontra-se na faixa etária dos 20-29, 26,32% na faixa etária dos 30-39 e 17,54% na faixa etária dos 40-49. Não foi encontrado nenhum funcionário com mais de 60 anos.

68,75%, dos funcionários adquiriram a sua formação profissional através da sua experiência profissional, em dois restaurantes, correspondendo a 12,50% frequentaram cursos com mais de 50 horas e têm também experiência adquirida noutros estabelecimentos, apenas 1 funcionário representando 6,25% tem formação superior e experiência profissional, 6,25% tem curso de 50 horas e outros 6,25% são sabe a formação dos funcionários do estabelecimento.

III.5.2. Variável Localidade

Na tabela 11 apresenta-se a distribuição dos restaurantes nas diferentes localidades em estudo ao nível da região Norte do país.

Tabela 11 : Variável Localidade

	Variável em estudo	23 Restaurantes (n%)
Localidade	Porto	12 (52,17)
	Matosinhos	3 (13,04)
	Maia	2 (8,70)
	Braga	2 (8,70)
	Vial Real	2 (8,70)
	Gaia	1 (4,35)
	Aveiro	1 (4,35)

Como era de esperar, mais de metade, representando 52,17% dos restaurantes encontram-se localizados na metrópole do Grande Porto, sendo uma cidade muito diversificada e multicultural, constituindo um nicho de mercado ideal para este tipo de restauração, em que a população está mais receptiva a novas experiências. De seguida está a cidade de Matosinhos com 3 restaurantes, representando 13,04%, estando a cidade localizada à beira mar torna-se mais propícia a receber turistas que estão mais familiarizados com a cultura e tradição nipónica. Em terceiro lugar vêm as cidades da Maia, Braga e Vila Real cada uma com 2 (dois) restaurantes. Por último, as cidades de Gaia e Aveiro, com apenas um restaurante cada.

III.5.3. Variáveis Origem Pescado, Média de Refrigeração e Tábua de Corte

Na tabela 12 apresentam-se os dados obtidos relativamente à Origem do pescado, ou seja, se é comprado fresco, congelado ou de ambas as formas, a forma de conservação e ainda se utiliza ou não a Tábua de Corte.

Tabela 12: Variáveis Origem, Refrigeração e Tábua de Corte

Variável em estudo		16 Restaurantes (n%)	
Origem	Fresco	16 (100,00)	
	Congelado	9 (56,25)	
Refrigeração (média em dias)	Fresco	>1	7 (43,75)
		2 a 3	9 (56,25)
	Congelado	>1	5 (55,56)
		2 a 3	4 (44,44)
Tábua de Corte	Sim	7 (43,75)	
	Não	9 (56,25)	

Na variável origem do pescado observamos que 100% dos inquiridos optam por comprar pescado fresco em detrimento do congelado, sempre que possível. Mas dos 16 (dezasseis) restaurantes, 9 (nove), representando 56,25% compram também congelado. Foi referido como exemplo o peixe manteiga, também estudado neste trabalho que tem de ser comprado congelado por ser uma espécie que não existe na costa portuguesa.

Relativamente à variável conservação do pescado, quando se trata do fresco, 56,25% dos inquiridos referem que em média conseguem manter o pescado em refrigeração cerca de 2 a 3 dias, podendo ser consumido até essa altura e apenas 43,75% dos inquiridos diz conseguir manter apenas um dia de refrigeração, sendo depois transferido para outra utilização, não podendo ser servido cru ao consumidor.

Com relação ao pescado congelado, segundo o apresentado na tabela 12 acontece o oposto. Dos nove restaurantes que usam pescado congelado, 5 (cinco), representando 55,56% referenciam que mantêm menos de um dia (<1) em refrigeração após descongelação e 44,44% dizem manter entre 2 a 3 dias, sendo passado esta data considerado subproduto e eliminado.

Na variável utilização de tábua de corte, 7 inquiridos, ou seja 43,75% referem que utilizam a mesma tábua de corte para diferentes operações, desde a evisceração e limpeza do pescado até à preparação das peças de *Sushi* e *Sashimi*, o que a nível de contaminação torna o pescado

mais susceptível, enquanto 56,25% dos inquiridos referem que utilizam diferentes tábuas de corte para diferentes operações.

III.5.4. Variável Vantagens da Utilização de Pescado Fresco

Foram avaliadas as vantagens que os inquiridos dos 16 restaurantes consideram existir em trabalhar com o pescado fresco em detrimento do pescado congelado. Como representado no gráfico 1, as vantagens referidas da utilização do pescado fresco dizem respeito à qualidade, textura, cor, sabor, estado de frescura, ausência de excesso de água, facilidade de trabalho e ter sido capturado recentemente.

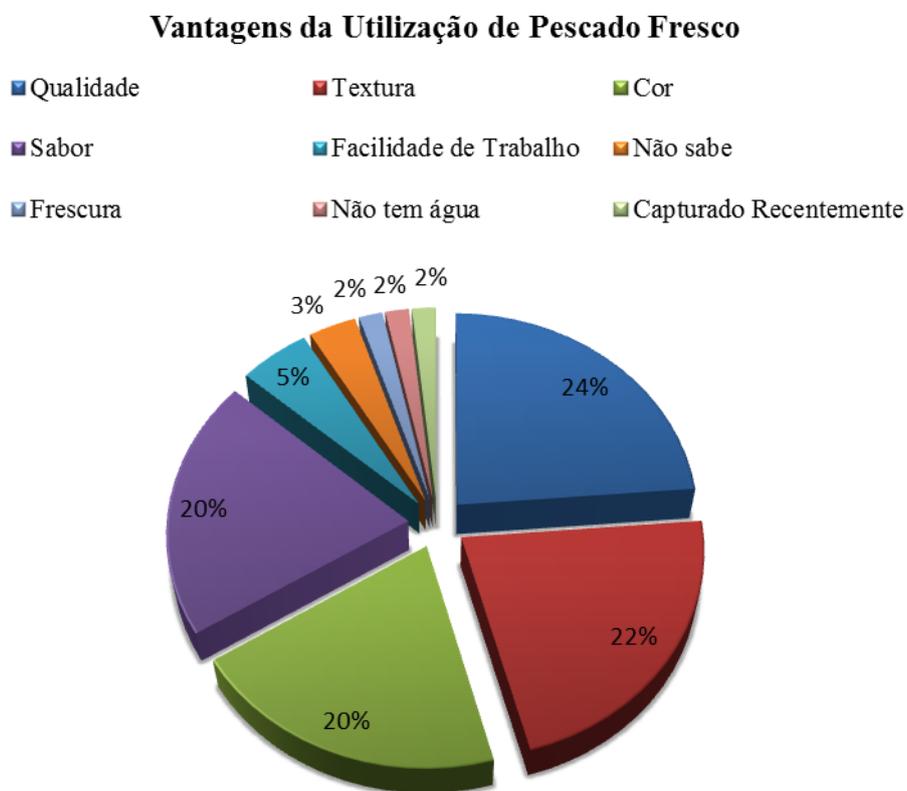


Gráfico 1: Vantagens da Utilização de Pescado Fresco

Assim sendo, 24% das respostas indicam que o pescado fresco tem uma maior qualidade quando comparado com o congelado; 22% das respostas indicam que a textura do fresco é melhor, assim como a cor e o sabor com 20%. A partir deste ponto as respostas têm uma pequena quantificação como a facilidade de trabalho que representa 5% das respostas. De facto alguns dos inquiridos referem que o pescado congelado é mais fácil de trabalhar, por já se encontrar limpo e sem espinhas sendo só descongelar e preparar as lascas de pescado para

cada peça. 2% das respostas dizem respeito ao facto dos comerciantes terem a certeza de que o pescado foi capturado recentemente, sabendo o seu grau de frescura através da confiança que estabelecem com o seu fornecedor e, também por ter menos água, assim sabem que estão a pagar o seu peso e não água pelo preço de peixe, como acontece quando o mesmo é congelado.

Como curiosidade temos que 3% dos inquiridos não sabem ou não vêem qualquer vantagem em usar o pescado fresco em vez do congelado.

III.5.5. Variável Desvantagens da Utilização de Pescado Fresco

No gráfico 2 apresentam-se as respostas (%) relativas às possíveis desvantagens que os inquiridos consideram quando se utiliza pescado fresco, nomeadamente o facto do pescado ser mais perecível, dificuldade de trabalho, ser mais propício a contaminação e levar a desperdício.

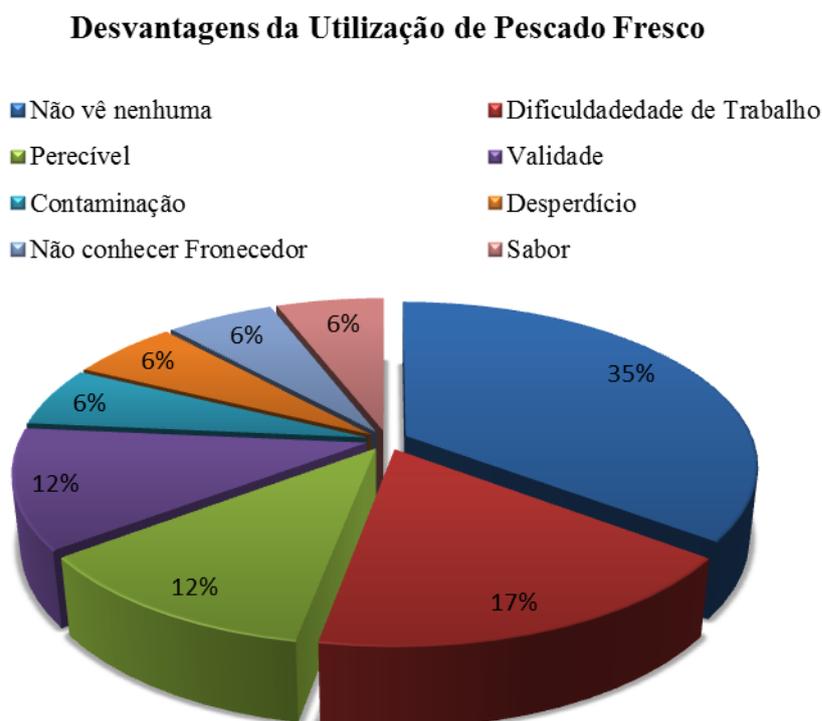


Gráfico 2: Desvantagens da Utilização de Pescado Fresco

Em grande destaque, com 35% das respostas indicam que não vêem nenhuma desvantagem na utilização de pescado fresco em comparação com o pescado congelado. 17% dos inquiridos referem a desvantagem de dificuldade de trabalho, pois têm de limpar o peixe, eviscerá-lo,

tirar as espinhas, o que requer muito tempo e cuidado para não danificar o pescado e causar contaminações. Relativamente à validade e perecibilidade do pescado fresco, 12% dizem ser uma desvantagem pois não conseguem armazenar aquelas peças muito tempo, 6% dizem que é de fácil contaminação, pelos motivos anteriormente descritos. O desperdício também é uma desvantagem, pois se não houver experiência do *Sushiman* muito desse pescado acaba por não ser utilizado e eliminado. 6% dos inquiridos dizem que o sabor do pescado fresco é diferente, mas altera-se mais rapidamente quando comparado com o congelado. Por fim, o facto de não terem confiança e de não conhecerem o seu fornecedor é uma desvantagem, representando 6% das respostas.

III.5.6. Utilização de Vegetais Desinfectados

Neste tipo de restauração faz parte da cultura as peças de *Sushi* ou *Sashimi* virem acompanhadas de vegetais, também eles sem confeção, pelo que se avaliou a percentagem da incorporação de vegetais desinfectados nas refeições estudadas (gráfico 3).

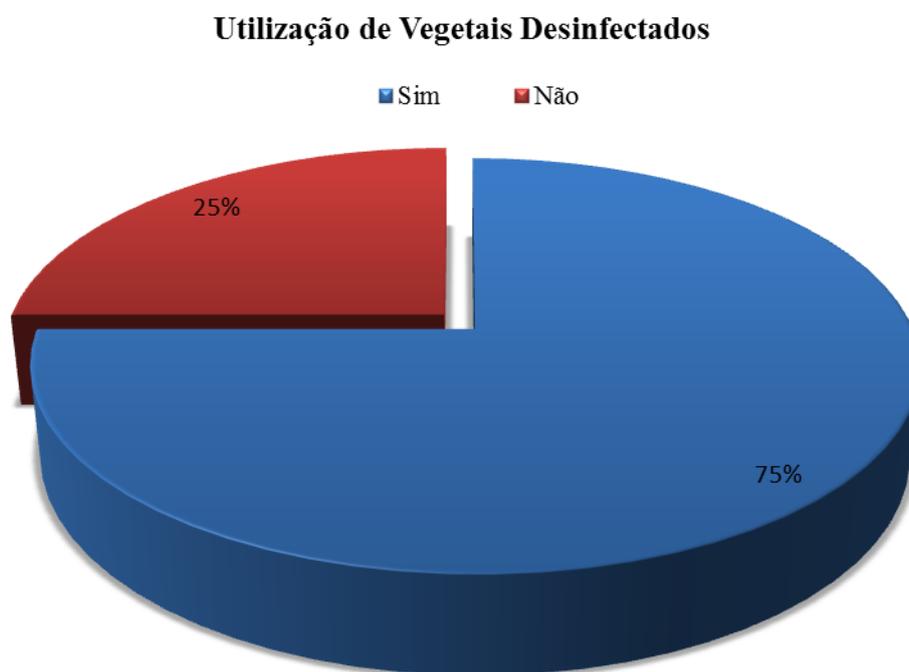


Gráfico 3: Utilização de Vegetais Desinfectados

Pela análise do gráfico 3 verifica-se que 75% das respostas foram afirmativas, referindo que os vegetais utilizados eram sempre desinfectados, com produtos químicos adquiridos para o

efeito ou então com produto natural como o limão. 25% dos inquiridos referem lavar os vegetais apenas em água, não utilizando qualquer tipo de desinfetante.

Apesar de 75% dos inquiridos afirmarem que desinfetam os vegetais, não nos podemos esquecer que se trata de uma amostragem pequena, o que indica que os 25% que lavam com água correm o risco de provocarem contaminações cruzadas.

III.5.7. No seu plano HACCP qual considera ser o PCC?

Os inquiridos foram questionados acerca do seu conhecimento sobre o plano de HACCP implementado nos estabelecimentos.

De seguida apresenta-se o resultado gráfico da resposta à questão “No seu plano de HACCP qual considera ser o Ponto Crítico de Controlo (PCC)” que tinha como opções as seguintes respostas: Recepção, Refrigeração, Preparação e Não Sei/Não Respondo.

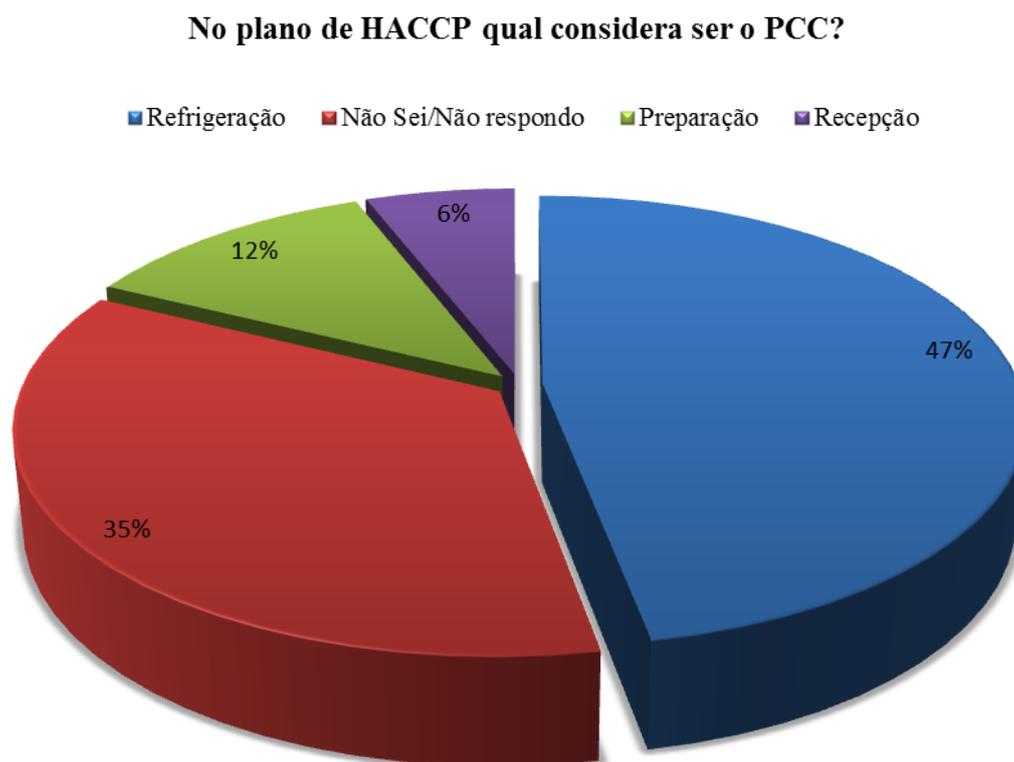


Gráfico 4: Qual o PCC no Plano de HACCP implementado

Em grande escala, com 47% das respostas os inquiridos consideram que o Ponto Crítico de Controlo (PCC) neste tipo de sistema é a refrigeração, cuja temperatura deve estar sempre

monitorizada e controlada, uma vez que estão a lidar com matérias-primas muito perecíveis, que facilmente se deterioram. 12% dos inquiridos referem que o PCC é a preparação, pois envolve uma técnica muito específica e necessita de ser controlada para que não haja contaminações. 6% dos inquiridos considera que o seu PCC está na recepção das matérias-primas que têm de ser inspeccionadas e analisadas para que não sejam entregues pescados já em estado deteriorado.

Como curiosidade temos em grande quantidade com um valor de 35% das respostas que não sabem qual é o PCC e, em alguns casos, até nem o que é o plano de HACCP.

Esta questão gerou um certo desconforto e confusão em alguns dos inquiridos que por falta de conhecimento do que é um plano de HACCP e do que é um PCC não souberam muito bem o que responder e ficaram com algumas dúvidas quando davam a sua resposta, na grande maioria dos casos foi mais uma opinião pessoal. Este facto é demonstrativo de falhas ao nível de conhecimentos do sistema de autocontrolo que deve estar implementado nos estabelecimentos.

O pescado deveria ser submetido a temperaturas e tempos de congelação e a boas práticas de manipulação durante a preparação para assim ser possível garantir um consumo seguro. A higiene dos manipuladores é um importante factor a considerar para a segurança dos consumidores, devendo os *Sushiman* por isso seguir um conjunto de procedimentos adequados que conduzam a uma preparação de refeições de pescado cru seguras.

É necessário continuar a implementar e a melhorar os sistemas de HACCP nestes tipos de estabelecimentos para poder ser garantido ao consumidor segurança e qualidade nas refeições de pescado cru.

IV. Conclusões

Cada vez mais está a introduzir-se nos hábitos dos portugueses o consumo de *Sashimi* e de *Sushi* e desta forma o aumento do número de restaurantes e de estabelecimentos por todo o território nacional com a oferta deste tipo de refeições.

O pescado fresco apresenta uma grande variedade de microrganismos, com um risco potencial para a saúde pública. De facto, o aumento do consumo de alimentos sem tratamentos térmicos, como o *Sashimi* e o *Sushi*, favorece uma maior incidência destes microrganismos, podendo ocorrer infeções e intoxicações de origem alimentar, com consequências na saúde da população.

Com este trabalho pretendeu-se portanto realizar uma abordagem ao consumo de pescado cru com valência para o consumo de *Sashimi*, pois este tema não está muito estudado e aprofundado do ponto de vista teórico e científico, nomeadamente nas várias vertentes da área da segurança alimentar, pelo que se conseguiu obter mais informação acerca da segurança sanitária de refeições preparadas em restaurantes no Norte de Portugal.

Todas as amostras apresentam um grau de frescura dentro dos parâmetros aceitáveis segundo o valor pH, teor de ABVT e as contagens de microrganismos indicadores.

Os valores obtidos para os parâmetros de qualidade indicam-nos que ainda existe um longo caminho a percorrer para a implementação e melhoria de planos de HACCP nestes estabelecimentos. Das 61 refeições analisadas 64% encontravam-se em nível insatisfatório, sendo os microrganismos indicadores deste estado *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e Bolores.

É de referir a detecção de *Listeria* spp. em uma amostra de Atum mas que se encontrava dentro dos valores guia de referência de Santos *et al.* (2005), mas que contribui para a classificação de insatisfatório. Contudo não foi detetada *Listeria monocytogenes*.

Não foram também detetados *E. coli*, *Salmonella* spp. e de *Clostridium perfringens* nas amostras analisadas. Foram encontradas quatro estirpes de Víbrios não patogénicos, são eles *Vibrio pelagius I* em Atum e Peixe manteiga, *Vibrio proteolyticus* em Salmão, *Vibrio mimicus* em Robalo e *Vibrio corarillilyticus* em Peixe manteiga.

Das diversas espécies que foram analisadas (Salmão, Atum, Robalo, Rodovalho, Peixe manteiga, Dourada Veieira e Pregado) a que se apresentou como sendo das mais

contaminadas foi a Vieira, ultrapassando os limites máximos de contagens para mesófilos, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus* e Bolores.

É importante entender se a contaminação das refeições de *Sashimi* surgem no momento da captura e na manipulação do pescado ou se se trata de contaminação cruzada na cozinha do restaurante. O uso de pescado fresco é um importante pré-requisito para se obter uma boa refeição de *Sashimi*.

Embora não tenham sido detetados a maioria dos microrganismos patogénicos pesquisados, os resultados obtidos neste estudo mostram que é necessário ter algumas preocupações com relação à microbiota que está presente no pescado e que pode aumentar os níveis de risco para os consumidores, pelo que é necessário garantir a implementação de boas práticas de higiene

Com o questionário que foi realizado aos restaurantes percebeu-se que alguns dos inquiridos não sabem o que é o plano de HACCP, nem quais as etapas mais importantes para controlo do pescado quando este entra nos estabelecimentos, pelo que consideramos necessário formar os profissionais desta área para que os riscos de contaminações destas refeições sejam cada vez mais reduzidos.

V. Referências Bibliográficas

- Agência Lusa (13/12/2006), <http://www.publico.pt/sociedade/noticia/espanha-peixe-para-consumir-cru-deve-ser-congelado-1279525>, acessado a 13/06/2013.
- Agnese, A.P., Oliveira, V.M., Silva, P.P.O., Oliveira, G.A., 2001. Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e enumeração de coliformes totais e fecais, em peixes frescos comercializados no município de Seropédica – Rio de Janeiro. *Higiene Alimentar*. v. 15. p. 67 – 70.
- Ahmed, F. E, 1991. *Seafood Safety*. National Academy Press, Washington D.C., USA.
- Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciananogués, T. *et al.*, 2002. Chemical and sensory changes in Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) under refrigeration (6-8 °C) and stored in ice. *Journal of Agriculture Food Chemistry*., v.50, p.6504-6510.
- Baker, D.A., 1995. Application of modeling in HACCP plan development. *International Journal Food Microbiology* 125, 251 – 261.
- Batista, I., Nunes, M., Martins, A., Delgado, N., Mendes, A. 2001. Relatório final do projeto – Monitorização da qualidade do pescado fresco e refrigerado descarregado em lota. Instituto de Investigação das Pescas e do Mar (IPIMAR). Lisboa.
- Baptista, P., Venâncio, A., 2003. Os Perigos para a segurança no Processamento Alimentar. Forvisão – Consultoria em Formação Integrada SA, ed 1
- Baptista, P., Linhares, M., 2005. Higiene e Segurança Alimentar na Restauração – Volume I Iniciação. Forvisão – Consultoria em Formação Integrada SA, ed 1
- Barber, K.; Takemura, H., 2008. *Sushi – Taste and Technique*. Dorling Kindersley – Civilização Editores, Lda. Porto
- Barros, G.C. 2003. Perda de qualidade do pescado, deteriora e putrefação. *Revista CFMV*.ano 9, n.30, Set/Dez. 59-64
- Beato, P.G. Características Organolépticas e Físico-química da carne de Piramutaba, *Brachyplatistoma vaillanti* (Siluriformes, Pimelodidae), congelada comercializada em Belo Horizonte - MG. 2002. 31p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte.
- Ben Embare, P. K. and H.H. Huss, 1992. Growth of *Listeria monocytogenes* in lightly preserved fish products. In *quality assurance in the fish industry*. Eds: H. H. Huss, M. Jacobsen and J. Liston. Elsevier Science Publishers, 293-304.
- Beraquet, N.J., Lindo, M.M.K., 1985. Transformações bioquímicas *post mortem* em pescado. *Boletim do Instituto Tecnológico de Alimentos*, v.22, n.2, p.169-192.

- Bourgeois, C.; Mesle, J.; Zucca, J., 1996. Microbiologie alimentaire. Technique & documentation. Espanha.
- Brasil., 1997b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Inspeção de Pescado e derivados. In: Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília: Ministério da Agricultura. p. 241.
- Braun, P., Sutherland, J.P., 2003. Predictive modeling of growth and enzyme production and activity by a cocktail of *Pseudomonas* spp., *Shewanella putrefaciens* and *Acinetobacter* spp. *Int J Food Microbiol* 86, 271 – 282.
- Cardoso, A.L.P.; Tessari, E.N.C.; Castro, A.G.M.; Kanashiro, A.M.I., 2001. A técnica de membrana filtrante, aplicada ao estudo bacteriológico da água de rede de abastecimento, utilizada pela população de Descalvado, São Paulo. *Higiene Alimentar*. 15: (82), 33-38.
- Chytiri, S., Chouliara, I., Savvaidis, I.N. and Kontominas, M.G., 2004. Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. *Journal of Food Microbiology* 21, 157-165.
- Cliver, D.O., 1988. Virus transmission via foods. *Food Technologie*. 42, 241–248.
- Colakoglu, F.A., Sarmasik, A. and Koseoglu, B., 2006. Occurrence of *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. in shellfish harvested off Dardanelles cost of Turkey. *Journal of Food Control*, v 17, p. 648-652.
- Commission., E., 1996. Council Directive 96/3/EC on the hygiene of foodstuffs. *Off J Eur Communities* 175, 1–11.
- Conde, J.M.M., 1975. Guia del inspector veterinário titular: 1- bromotologia sanitaria. Barcelona: Biblioteca Veterinária Aedos. p.190-260.
- Corbo, M.R., Speranza, B., Filippone, A., Granatiero, S., Conte, A., Sinigaglia, M., Del Nobile, M.A., 2008. Study on the synergic effect of natural compounds on the microbial quality decay of packed fish hamburger. *International Journal of Food Microbiology*. 127, 261–267.
- Dalgaard, P., Manfio, G.P., Goodfellow, M., 1997. Classification of *Photobacteria* Associated with Spoilage of Fish Products by Numerical Taxonomy and Pyrolysis Mass Spectrometry, *Zbl. Bakt.*, v 285, 157-168.
- Decreto-Lei 223/2008 de 18 de Novembro. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.
- Delazari, I., Camargo, R., Leitão, M.F.F., Santos, C.A., Anderson, A.W., 1984. *Clostridium botulinum* em pescado do litoral do Estado de São Paulo. *Colectânea do ITAL*. nº. 12.

- Edwards, R.A., Dainty, R.H. and Hibbard, C.M., 1987. Volatile compounds produced by meat pseudomonads and related reference strain during growth on beef stored in air at chill temperatures. *J Appl Bacteriol* 62, 403 – 412.
- Exposto, F., 2000. *Microbiologia*. Lidel – edições técnicas, Lda. v. 2. Capítulo 4. p. 63 – 69.
- FAO Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura Roma, 1997 *Garantia da qualidade dos produtos da pesca*, H.H. Huss Departamento de Investigação dos produtos da pesca Ministério da Agricultura e da Pesca Dinamarca Governo Dinamarquês.
- Fang, T., Wei, Q., Liao, C., Hung, M., & Wang, T., 2003. Microbiological quality of 18°C ready-to-eat food products sold in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology*, 80, p. 241-250.
- Feng, P.; Weagant, S.D.; Grant, M.A., September 2002. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. *Bacteriological Analytical Manual online*. 8.ed.
- Ferreira Canas, W.F., Sousa, J.C., Lima, N., 2010. *Microbiologia*. p. 166-195: Edit. Lidel..
- Franco, B.D.G.M.; Langarf, M., 2005. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu., p. 182.
- Fontes, M.C.; Esteves, A.; Caldeira, F.; Saraiva, C.; Vieira-Pinto, M.; Martins, C., 2007. Freshness and hygienic quality of fish sold in a Portuguese town. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 59 (5): 1308-1315.
- Gerba, C. P., 1988. Viral disease transmission by seafoods. *Food Technologie*. 42, 99–102.
- Gerba, C. P. e S. M. Goyal, 1978. Detection and occurrence of enteric viruses in shellfish: A review. *Journal Food Protect*. 41, 742.
- Germano, P.M.L.; Oliveira, J.C.F.; Germano, M.I.S., 1993. O pescado como causa de toxinfecções bacterianas. *Higiene Alimentar* 7:(28), 40-45.
- Germano, M.I.S.; Germano, P.L.; Oliveira, C.A.F., 1998. Aspectos da qualidade do pescado de relevância em saúde pública. São Paulo. Citado na Revista Produção Online, Florianópolis, v.6, n.3,p.93, set./dez., 2006
- Gilbert, R.J., Louvois, J., Donovan, T., Little, C., Ribeiro, C.D., Richards, J., Roberts, D., Bolton, F.J., 2000. Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point for sale. *Communicable Disease and Public Health*, v. 3, 163 – 167.

- Gillespie, N.C., 1981. A numeral taxonomic study of *Pseudomonas* like bacteria isolated from fish in Southeastern Queensland and their association with spoilage. *J Appl Bacteriol* 50, 29 – 44.
- Gram, L., Dalgaard, P., 2002. Fish spoilage bacteria – problems and solutions. Elsevier Science, p. 262 - 266
- Gram, L., Huss, H.H., 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33, 121-137.
- Gram, J.E., Gould, L.H., Mahon, B.E., 2010. Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Clostridium perfringens*, United States, Atlanta Research & Education Foundation, Atlanta, Geórgia, EUA.
- Guimarães, J.L., 2000. Conservação pelo frio – refrigeração e congelamento de pescado. In: Semana de Ciência e Tecnologia Agro-pecuária, Jaboticabal. Anais. Jaboticabal: p. 176.
- Guyer, S.; T, Jemmi, 1991. Behavior of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentally contaminated smoked salmon. *Appl. Environ. Microbiology*. 57, 1523-1527.
- Hayes, P.R., 1993. Food Microbiology and Hygiene, Editorial: Elsevier Applied Science Publishers Ltd., p. 4.
- Hazen, T., 1988. Fecal coliforms as indicators in tropical waters: A review. *Toxic Assess.* 3, 461-477.
- Heredia, Norma; Wesley, Irene; García, Santos., 2009. Microbiologically Safe Foods, Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Howgate, P., 2009. Traditional methods. In: Fishery products: quality, safety and authenticity. Rehbein, H., Oehlenschläger, J., Eds.; Blackwell Publishing Ltd; Oxford; pp 19-41.
- Huss, H., 1995. Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical Paper*, nº 348, Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO, Rome; p. 195.
- Hubbs, J., 1991. Fish: microbiological spoilage and safety. *Food Science Technology Today* 5, 166-173.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) 1998. Microorganism in Foods, 6: Microbial Ecology of Food Commodities. Blackie Academic & Professional.
- Instituto Nacional de Estatística, INE, (2008), Anuário Estatístico de Portugal 2007.

- ISO 4833:1991 Microbiology -- General guidance for the enumeration of micro-organisms -- Colony count technique at 30 °C.
- ISO 5552:1997 Meat and meat products -- Detection and enumeration of Enterobacteriaceae without resuscitation -- MPN technique and colony-count technique.
- ISO 6579:2002 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
- ISO 7932:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* -- Colony-count technique at 30 °C.
- ISO/WD 11290-1:1998 Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species -- Part 1: Detection method.
- ISO 13681:1995 Meat and meat products -- Enumeration of yeasts and moulds -- Colony-count technique.
- ISO 16649-2:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* -- Part 2: Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide.
- ISO/TS 21872-1:2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. -- Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*.
- Jay, J.M. Modern food microbiology, 2002. Zaragoza: Acribia 4. ed. p. 615.
- Jay, J.M. Food microbiology, 2005. Porto Alegre: Artmed 6.ed. p. 711.
- Jiménez, L.; Munir, J.; Toranzos, G.G.; Hazen, T.C., 1989. Survival and activity of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in tropical fresh water. Journal Appl. Bacteriological. 67, 61-69.
- Jouve, J.L., 1994. HACCP as applied in the EEC. Journal of Food Control 5, p. 181 - 186.
- Khashe, S.; Janda, M.J., Mars 1998. Biochemical and Pathogenic Properties of *Shewanella* alga and *Shewanella putrefaciens*, Microbial Diseases Laboratory, Division of Communicable Disease Control, California Department of Health Services, Berkeley, Journal Of Clinical Microbiology, p. 783–787.
- Kilgen, M. B. e M. T. Cole, 1991. Viruses in seafood. In *Microbiology of Marine Food Products*. Eds: D. R. Ward and C. Hackney. Van Nostrand Reinhold, 197–209.

- Kornacki, J.L.; Johnson, J.L., 2001. *Enterobacteriaceae*, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: Downes, F.P.; Ito, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4.ed. Washington: APHA, cap.8, p 69-71.
- Koutsoumanis, K. and Nychas, G.J.E., 1999. Chemical and Sensory Changes associated with microbial flora of bogue (Boops boops) stored aerobically at 0, 3, 7 and 10 °C. *J Appl Environ Microbiol* 65, 698 – 706.
- Lacasse, D., 1995. Introdução à Microbiologia Alimentar. 1.^a Edição. Coleção Ciência e Técnica do Instituto Piaget. Lisboa.
- Lima, R.M.T., Shinohara, N.K.S., Siqueira, L.P., Lima, R.C.T., Pires, E.F., Ximenes, G.N.C, Barbosa, V.B., 2009. Avaliação microbiológica de *sushis* e *sashimis* comercializados na cidade do Recife – PE. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Lima dos Santos, C.A.M., 1981. The storage of tropical fish in ice – a review. *Trop Sci* 23, 97 – 127.
- Lira, G.M., Pereira, W.D., Athyde, A.H., 2001. Avaliação da qualidade de peixes comercializados na cidade de Maceió – AL. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 15, n° 84, p. 67 – 74.
- Lopes, J.A.A., 2000. Microbiologia. Lidel – edições técnicas, Lda. v. 2. Capítulo 5. p. 71 – 74.
- Mayer, B.K.; Ward, K.R., 1991. Microbiology of finfish and finfish processing. In: Ward, D.R.; Hackney, C.R. Microbiology of marine food products. New York: Van Nostrand Reinhold, Cap. 1, p.1-17.
- Martins, M.L.; Onaka, E.M.; Moraes, F.R.. 2002. Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the state of São Paulo, Brazil. *Acta Sci.*, v.24, p.981-985.
- McCoy, E., Morrison, J., Cook, V., Johnston, J., Eblen, D., Guo, C., 2010. Foodborne Agents Associated with the Consumption of Aquaculture Catfish. *Journal of Food Protection*, v. 74, n°. 3, p 500–516.
- Melnick, J. C. e C. P. Gerba, 1980. The ecology of enteroviruses in natural waters. *CRC Crit. Rev. Environ.* 10, 65.
- Melo Cristino, J., 1991. Infecções Estafilocócicas. *Revista do Interno*. n° 2. p. 35 – 46.
- Miller III, A., Scanlan, R.A., Lee, J.S. and Libbey, L.M., 1973. Identification of volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens* and *Achromobacter* species. *Journal Application Microbiology* 26, 18 - 21.

- Mitchell, R.T., 2000. Practical Microbiological Risk Analysis. ed. Oxford, C.P.L. p.105.
- Mohamed Hatha, A.A.; Lakshmanaperumalsamy., 1997. Prevalence of *Salmonella* in fish and crustaceans from markets in Coimbatore, South India. Food Microbiology, v. 14, p. 11-116.
- Mossel, D.A.A., Corry Janet, E.L., Struijk Corry, B. and Baird Rosamund, M., 1995. Essentials of the Microbiology of Foods: A Textbook of Advanced Studies. In London, John Wiley & Sons.
- Muratori, M.C.S., 2000. Consórcio suíno peixe: riscos ambiental e sanitário. Proposta alternativa para descontaminação. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte.
- Neves, C. Diário de Notícias (18/05/2008) http://www.dn.pt/especiais/interior.aspx?content_id=1012158&especial=ASAE&secao=SOCIEDADE, acessido a 13 de Junho de 2013.
- Noble, R.T., Moore, D.F., Leecaster, M.K., McGee, C.D. Weisberg, S.B., 2003. Comparison of total coliform, fecal coliform, and Enterococcus bacterial indicator response for ocean recreational water quality testing. Journal Water Research 37. 1637-1643.
- Norma Francesa NF V04-503-1988 Meat and meat products. Enumeration of Lactic Bacteria
- Norma Francesa NF V04-504-1998 Microbiology of food and animal feeding stuffs. Enumeration of *Pseudomonas* spp. In meats and meat products.
- Norma Portuguesa NP-870 de 1988. Microbiologia Alimentar. Alimentos para animais. Pesquisa de *Salmonella*.
- Norma Portuguesa NP-2262, 1986: Microbiologia alimentar : regras gerais para a pesquisa de esporos de Clostrídios sulfito-redutores.
- Norma Portuguesa NP-2287 de 1985 a. Classificação do frescor do peixe. Lisboa: Instituto Português de Qualidade, 5p.
- Norma Portuguesa NP-2307, 1987, Microbiologia alimentar: regras gerais para a contagem de microrganismos psicotróficos.
- Norma Portuguesa NP-2930 de 1985 a. Determinação do teor de azoto básico volátil total (ABVT). Método de Conway. Lisboa: Instituto Português de Qualidade, 5p.
- Norma Portuguesa NP-3788, 1990: Microbiologia alimentar: Regras gerais para a contagem de bactérias coliformes a 30 C.

- Norma Portuguesa NP 4400-1:2002 Microbiologia Alimentar, Regras gerais para contagem de estafilococos coagulase positiva (*Staphylococcus aureus* e outras espécies) Parte 1: Técnica com confirmação de colónias.
- Oehlenschläger, J.; Sørensen, N.K., 1997. Criteria of fish freshness and quality aspects. In: The Final meeting of the Concerted Action - Evaluation of Fish. p.30-35.
- Oetterer, M., 2003. O Processo de Fermentação do Pescado. São Paulo: USPP. Citado em Revista Produção Online, Florianópolis, v.6, n.3,p.94, set./dez., 2006
- Ogawa, N.B.P.; Maia, E.L., 1999. Manual de Pesca: ciência e tecnologia do pescado. São Paulo: Livraria Varela. 1, 430.
- Özogul F., Özogu Y., 1999. Comparison of Methods Used for Determination of Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N) in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Tubitak. 24. 113-120.
- Pelczar, J.R.M.J., Chan, E.C.S. and Kreig, N.R., 1997. Microbiologia: Conceito e aplicações, p. 371-397. São Paulo: McGraw-Hill.
- Portal de Segurança Alimentar, 2013. Hazard Analysis Critical Control Points. <http://www.segurancalimentar.com/conteudos.php?id=240>, acessido em 26 de Junho de 2013.
- Portaria n.º 559/76 de 7 de Setembro. Regulamento de Inspeção e Fiscalização Higiéno-Sanitárias do Pescado.
- Ramos, P., 2011. Anisakis spp. in Cod, *Sushi* and *Sashimi*: risk of parasitic infection and allergy, Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias nº110, p. 87-97.
- Ray, B. and Bhunia, A., 2008. Fundamental Food Microbiology. pp.30-31, 37-38, 53, 57-58, 60-61, 212-213, 225-226, 269-271, 294-298, 315-316, 352-354, 441, 444-445, 471-474: CRC Press, Taylor & Frands Group Tayler
- Regulamento (CE) nº 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios.
- Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal.
- Regulamento (CE) N° 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007.
- Regulamento (CE) N°. 2074/2005 da Comissão de 5 de Dezembro de 2005 que estabelece medidas de execução para determinados produtos ao abrigo do Regulamento (CE) n°. 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho e para a organização de controlos

- oficiais ao abrigo dos Regulamentos (CE) n.º. 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho e n.º. 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, que derroga o Regulamento (CE) n.º. 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho e altera os Regulamentos (CE) n.º. 853/2004 e (CE) n.º. 854/2004.
- Ribeiro, A.M.R., 1974. Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses. v.5, n,1, p. 17-25.
- Richards, G.P., Watson, M.A., Crane, E.J., Burt, I.G., Bushek, D., June 2008. *Shewanella* and *Photobacterium* spp. in Oysters and Seawater from the Delaware Bay, *Applied And Environmental Microbiology*, v. 74, p. 3323–3327
- Rhodes, M.W.; Kator, H., 1988. Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in estuarine environments. *Appl. Environ. Microbiological*. 54, 2902-2907.
- Roberts, D. and Greenwood, M., 2003. *Practical Food Microbiology*. pp.15-18, 55-56, 157-158, 160, 166-167: Blackwell Publishing.
- Rørvik, L.M.; Yndestad, M., 1991. *Listeria monocytogenes* in Foods in Norway. *Int. Journal Food Microbiological*. 13, 97-104.
- Rørvik, L.M.; Yndestad, M.; Skjerve, E., 1991. Growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum packet smoked salmon during storage at 4°C. *Int. Journal Food Microbiological*. 14, 111-117.
- Sá-Correia, I., 2000. *Microbiologia*. Lidel – edições técnicas, Lda. v. 2. Capítulo 10. p. 123 – 136.
- Sanath Kumar, H.; Sunil, R.; Venugopal, M.N.; Indrani Karunasagar; Iddya Karunasagar, 2003. Detection of *Salmonella* spp. in tropical seafood by polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology*. 88, 91–95.
- Santos, M. I. C., Cristina; Cunha, M. Isabel Campos; Saraiva, M. Margarida; Novais, M. Rosário, 2005. Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração, *Revista da Ordem dos Farmacêuticos*, Ordem dos Farmacêuticos, p. 66-68.
- Schneider, K.R.; Goodrich-Schneider, R.; Hubbard, M.A.; Sampath, D.M., 2010. Preventing Foodborne Illness Associated with *Clostridium perfringens*. Food Science and Human Nutrition Department, Florida Cooperative Extension Service, IFAS, University of Florida.
- Tang, Y. W., J. X. Wang, Z. Y. Xu, Y. F. Guo, W. H. Qian e J. x. Xu, 1991. A serologically confirmed case-control study of a large outbreak of hepatitis A in China, associated with consumption of clams. *Epidemiol. Infect.* 107, 651–657.

- Vanne, L., Karwoski, M., Karppinen, S. and Sjöberg, A.M., 1996. HACCP - based food quality control and rapid detection methods for microorganism. *Journal of Food Control* 7, 263 -276.
- Varman, A.H. and Evans, M.G., 1996. Foodborne pathogens. An illustrated text Marison publishing, p.501.
- Veiga, A., Lopes, A., Carrilho, E., Silva, L., Dias, M. B. Seabra, M. J., João M., Borges, M., Fernandes, P., Nunes, S., 2008. Perfil de Risco dos Principais Alimentos consumidos em Portugal. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE). Lisboa.
- Vieira, R.H.S.F.; Rodrigues, D.P.; Barreto, N.S.E. *et al.*, 2003. Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática. São Paulo: Livraria Varela.
- Yoshino, M., 1997. *Sushi: The Delicate Flavour of Japan*. Japan Publications Trading Co.
- Ward, R. L. e E. W. Akin, 1983. Minimum infective dose of animal viruses. *Crit. Rev. Environ. Control*. 14, 297–310.
- Weagant, S.D.; Sado, P.N.; K. and G. Colburn, 1989. The incidence of *Listeria* species in frozen seafood products. *Journal Food Protect*. 51, 655-657.

Anexo I

Meios de Cultura

Anexo A.1. Meio de Glucose Agar

Triptona	10g
Extracto de levedura	1,5g
Glucose	10g
NaCl	5g
Purpura de Bromocresol	0,015g
Agar-agar	8g
Água destilada	1000cm ³

pH 7,0

Anexo A.2. Lyngby Iron Agar

Peptona	20g
Agar	12g
NaCl	5g
Extracto de carne	3g
Extracto de levedura	3g
L-cystine	0,6g
Citrato de ferro	0,3g
Na ₂ S ₂ O ₃	0,3g
Água destilada	1000cm ³

pH 7,4

Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

Anexo A.3. VL (s) e VL (2x)

	VL (s)	VL (2x)
Extracto de carne	8g	4g
Extracto de levedura	10g	5g
Triptona	20g	10g
Glucose	4g	2g
Amido Solúvel	2g	1g
Cloridrato de L-cisteína	0,6g	0,3g
Cloreto de Sódio	10g	5g
Agar-agar	16g	8g
Água destilada	1000cm ³	1000cm ³

pH 7,1

Esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Aditivos

Solução Sulfito de sódio

Sulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	10g
Água destilada	1000cm ³

Esterilizar por membrana filtrante e conservar em refrigeração.

Solução Ferro Amoniacal

Sulfato de ferro III amoniacal ($\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)$)	5g
Água destilada	1000cm ³

Esterilizar por membrana filtrante. Conservar em refrigeração mas não utilizar para além de 10 dias.

Meio Completo

	VL (s)	VL (2x)
Meio Base	10cm ³	10cm ³
Solução sulfito sódio	0,5cm ³	1,0cm ³
Solução ferro amoniacal	0,25cm ³	0,5cm ³

Anexo A.4. Solução de Sulfametazina

Sulfametazina	0,2g
Solução de NaOH 0,1 mol/dm ³	10cm ³

Dissolve-se a sulfametazina na solução de hidróxido de sódio e completa-se até perfazer o volume de 100 cm³.

Anexo A.5. Meio de Chapman

Triptona	10g
Extracto de carne	12g
Protease de peptona	10g
NaCl	150g
Lactose	15g
Agar-agar	0,5g
Água destilada	1000cm ³

pH 7,4

Anexo A.6. Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MYP)

Extracto de carne	1g
Peptona	10g
Manitol	10g
NaCl	10g
Vermelho de Fenol (1% da solução em 95% etanol)	2,5cm ³
Agar-agar	15g
Água destilada	900cm ³

pH 7,2±0,2

Solução a 0,1% Polymyxin B	10cm ³
Bacto Egg Yolk Enrichment 50%	50cm ³

Anexo A.7. ASPW

Peptona	20g
NaCl	20g
Água destilada	1000cm ³

Esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Anexo A.8. TSAT

Triptona	15g
Peptona Soja	5g
NaCl	30g
Sacarose	20g
Saia Biliares nº3	0,5g
Agar	13g
Água destilada	1000cm ³

pH 7,1

Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

Solução a 1% de Cloreto de Trifeniltetrazólio

Cloreto de Trifeniltetrazólio	0,1g
Água destilada	10cm ³

Esterilização por membrana filtrante. Conservar em refrigeração.

Meio Final

Para cada 1000cm³ de Meio Base adiciona-se 3cm³ de solução a 1% e distribui-se por placas.

Anexo A.9. TSI salino

TSI	59,7g
NaCl	30g
Água destilada	1000cm ³

Distribuir 10ml em tubos e autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Para arrefecer inclinar os tubos para formação de cunha.

Anexo A.10. NSA

Extracto de carne	5g
Peptona	3g
NaCl	10g
Agar	13g
Água destilada	1000cm ³

Esterilização em autoclave durante 15 minutos a 121°C. Deixar arrefecer até 45-50°C e distribuir por placas. Conservar em refrigeração.

Anexo A.11. O/F Medium

NaCl	5g
Peptona	2g
Azul de Bromotimol	0,03g
Agar	3g
K ₂ HPO ₄	0,3g
Solução de Carbohidrato	100cm ³
Água destilada	1000cm ³

Misturar todos os componentes do meio com excepção da solução de carbohidrato, deixar entrar em ebulição e distribuir 3ml por tubo. Levar à autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Solução de Carbohidrato

Carbohidrato	10g
Água destilada	100cm ³

Neste caso o carboidrato utilizado foi a glucose. Adicionar a água destilada e esterilizar por membrana filtrante.

Meio final

Deixar o meio base arrefecer até 45-50°C e adicionar a cada tubo 0,3ml da solução de hidratos de carbono, misturar bem e deixar solidificar.

Anexo A.12. TSA-YE

Triptona	17g
Peptona de soja	3g
Extracto de Levedura	63g
Glucose	2,5g
Dipotássio de Fosfato	2,5g
Cloreto de Sódio	5g
Agar-agar	11g
Água destilada	1000cm ³

pH 7,3

Esterilização em autoclave durante 15 minutos a 121°C. Deixar arrefecer até 45-50°C e distribuir por placas. Conservar em refrigeração.

Anexo B.1 Inquérito



Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Inquérito *Sushi*

Sou aluno de Segurança Alimentar da UTAD (Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro) e no âmbito de um trabalho de Tecnologia alimentar escolhi fazer um estudo estatístico sobre a preparação de *Sushi*, comida que aprecio muito, mais propriamente a preparação *Sashimi*.

O objectivo deste inquérito é saber mais sobre o processo de preparação de refeições japonesas, mais propriamente *Sashimi*, no norte de Portugal.

1-Responde ao questionário?

- Sim
- Não

2-Distrito do restaurante “*Sushi*”: _____

3-Quantos funcionários têm o restaurante? _____

4-Qual a idade dos seus funcionários?

- 16-19 _____
- 20-29 _____
- 30-39 _____
- 40-49 _____
- 50-59 _____
- + 60 _____

5-Dos vários pratos que prepara quais são os que utilizam peixe cru (sem aquecimento)?

- nigiri-zushi (dedos de arroz - finger *Sushi*)
- Temaki-zushi (cones de algas)
- Ura-maki-zushi (arroz exterior com algas interior)
- Maki-zushi (algas exterior)
- Chirashi-zushi (salada)
- Sashimi* (filetes de peixe cru)
- Outro (s): _____
- Não tenho pratos com peixe cru



FORMAÇÃO

6-Que tipo de formação?

- ✓ Experiência pessoal no país de origem
- ✓ Curso com menos de 50h
- ✓ Curso com mais de 50h
- ✓ Outro: _____

ORIGEM DO PESCADO

7-Qual a origem do peixe utilizado para as preparações com peixe cru?

- ✓ Ultracongelado (-18°C)
- ✓ Congelado (-12°C)
- ✓ Fresco – Lota
- ✓ Fresco – Supermercado
- ✓ Fresco – Mercado
- ✓ Fresco – Peixaria
- ✓ Outro: _____

Nota: Se apenas utilizar peixe congelado ou ultracongelado salte para a questão número 11.

PESCADO FRESCO

8-Acha vantajoso trabalhar com peixe fresco?

- ✓ Sim
- ✓ Não

VANTAGENS

9-Quais as vantagens?

- ✓ Qualidade
- ✓ Textura
- ✓ Cor
- ✓ Sabor
- ✓ Facilidade de trabalho
- ✓ Outro: _____



10-Em média quantos dias mantém um peixe em refrigeração (fresco)

- ✓ <1
- ✓ 2 a 3
- ✓ 4 a
- ✓ 6 a 7
- ✓ 8 a 9
- ✓ +10

DESVANTAGENS

11-Quais as desvantagens da utilização de peixe fresco?

- ✓ Segurança Alimentar
- ✓ Textura
- ✓ Cor
- ✓ Sabor
- ✓ Facilidade de trabalho
- ✓ Outro: _____

PESCADO CONGELADO

12-Como procede à descongelação?

- ✓ Refrigeração (frigorífico) 5°C
- ✓ Temperatura ambiente
- ✓ Água
- ✓ Outro: _____

13-Em média quantos dias mantém um peixe no frio (frigorífico) após a retirada do peixe da arca de congelação?

- ✓ <1
- ✓ 2 a 3
- ✓ 4 a
- ✓ 6 a 7
- ✓ 8 a 9
- ✓ +10



TIPO DE CORTE

14-Compra o peixe

- Inteiro
- Partes (lombos, caudas, etc.)
- Filetes
- Outro: _____

15-A tábua de corte do peixe cru é utilizada para o corte de outras peças de *Sushi* e/ou vegetais?

- Sim
- Não
- Outro: _____

16-Os vegetais frescos utilizados são desinfectados?

- Sim
- Não
- Outro: _____

17-Que tipo de produto utilizado na desinfeção dos vegetais?

- Pastilhas
- Líquido
- Outro: _____

SISTEMA HACCP

18-No seu sistema HACCP, qual o PCC (Ponto Crítico de Controlo)?

- Não sei/Não respondo
- Recepção
- Refrigeração
- Preparação
- Outro: _____

Anexo II

Tabela 13: Microbiota presente em 61 amostras de Sashimi.

Amostra	Pescado	pH	ABVT	Mesófilos	Psicrófilos	Enterobacteriac eae	BAL	Pseudomonas.	Shewanella putrefaciens	Coliformes Totais.	S. aureus	Vibrio spp.	LM/LI	Listeria spp	Clostridium spp	B. cereus	Bolores	Leveduras
1	A	5,931	15,56	2,34E+03	4,01E+04	0,00E+00	1,47E+03	3,44E+03	1,00E+01	7,00E+02	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+00	2,48E+00
2	S	6,250	25,93	2,56E+03	2,26E+04	0,00E+00	1,06E+03	0,00E+00	0,00E+00	3,00E+02	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	2,00E+00	2,48E+00
3	R	5,545	17,11	1,29E+03	2,21E+03	5,25E+02	8,95E+02	0,00E+00	0,00E+00	2,00E+02	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+00	2,30E+00
4	A	5,803	16,97	6,70E+05	1,23E+06	1,54E+05	1,23E+06	0,00E+00	1,40E+03	6,20E+04	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	3,45E+00	5,08E+00
5	S	6,250	17,74	2,52E+05	2,53E+05	1,19E+04	6,02E+04	6,55E+03	9,90E+02	7,20E+04	0,00E+00	0,00E+00	N	N	1,00E+01	5,00E+01	3,20E+00	3,86E+00
6	R	5,545	17,11	2,26E+05	2,38E+05	3,65E+03	1,56E+05	0,00E+00	7,70E+02	5,10E+05	0,00E+00	0,00E+00	N	N	1,00E+01	0,00E+00	3,52E+00	4,42E+00
7	S	6,060	17,74	2,48E+07	1,40E+04	8,45E+02	4,84E+04	1,50E+03	0,00E+00	1,03E+04	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	2,95E+00	3,38E+00
8	S	6,022	17,74	3,68E+07	3,59E+03	7,80E+02	7,64E+03	3,22E+03	1,00E+01	5,90E+03	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+00	2,60E+00
9	S	6,165	16,71	8,61E+04	1,28E+05	1,82E+04	3,97E+04	0,00E+00	3,92E+03	7,03E+05	3,24E+03	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,38E+00
10	S	6,192	17,86	4,49E+05	5,58E+05	2,92E+05	9,06E+04	2,39E+05	0,00E+00	2,02E+06	1,68E+02	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	2,60E+00	3,20E+00
11	R	6,347	17,86	9,60E+02	4,40E+02	6,37E+04	2,75E+04	2,18E+04	1,32E+04	1,66E+06	2,02E+03	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	3,20E+00	3,80E+00
12	R	6,096	17,86	4,49E+04	1,07E+05	6,79E+03	2,82E+04	7,92E+03	1,47E+04	5,79E+05	1,79E+03	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+00	2,30E+00
13	S	5,735	34,00	8,02E+04	7,40E+04	7,57E+03	6,50E+04	1,28E+03	9,20E+02	5,32E+04	1,17E+02	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	3,11E+00	4,18E+00
14	A	6,389	14,41	3,01E+04	3,74E+03	9,00E+02	7,06E+03	0,00E+00	1,64E+04	7,60E+02	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	4,00E+02	2,00E+00	3,73E+00
15	V	6,179	14,41	5,31E+04	1,40E+05	1,84E+04	1,63E+04	0,00E+00	1,07E+04	5,32E+04	2,46E+03	0,00E+00	N	N	1,00E+01	0,00E+00	3,32E+00	3,57E+00
16	S	6,108	18,44	2,72E+06	2,19E+06	3,42E+05	3,19E+06	0,00E+00	1,15E+07	P	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	3,04E+00	5,02E+00
17	R	6,112	17,86	1,11E+05	6,39E+06	2,31E+04	1,21E+05	4,28E+04	5,90E+02	3,92E+05	1,85E+02	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+00	3,81E+00
18	A	5,990	18,37	3,79E+05	9,24E+03	1,13E+05	8,34E+04	0,00E+00	7,90E+04	5,71E+02	0,00E+00	0,00E+00	N	P	0,00E+00	0,00E+00	3,23E+00	2,78E+00
19	S	5,849	16,58	1,97E+05	2,80E+05	3,93E+03	9,83E+04	0,00E+00	1,79E+05	1,57E+03	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	2,00E+00	3,28E+00
20	S	6,088	17,00	3,76E+04	1,95E+05	6,07E+03	1,69E+05	5,85E+04	0,00E+00	1,10E+04	1,55E+02	0,00E+00	N	N	0,00E+00	8,00E+02	2,00E+00	0,00E+00
21	A	5,731	26,07	1,89E+05	3,59E+04	9,50E+01	3,20E+03	2,80E+06	0,00E+00	1,40E+03	1,95E+02	0,00E+00	N	N	0,00E+00	2,60E+02	0,00E+00	2,00E+00
22	A	5,841	10,20	4,45E+05	1,15E+06	1,73E+05	1,63E+06	1,60E+01	0,00E+00	3,96E+06	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+00	4,13E+00
23	R	6,244	19,83	1,16E+07	1,81E+07	1,27E+06	7,89E+05	3,18E+02	0,00E+00	3,51E+06	2,68E+02	0,00E+00	N	N	0,00E+00	4,54E+04	0,00E+00	4,03E+00
24	S	6,112	15,02	1,35E+05	1,14E+06	1,56E+06	4,97E+04	0,00E+00	1,01E+07	2,40E+01	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	2,00E+00	3,92E+00
25	A	5,368	16,97	1,13E+05	2,64E+05	4,01E+04	2,47E+04	3,50E+01	0,00E+00	1,93E+05	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	4,40E+01	3,15E+00	4,10E+00
26	S	5,966	17,74	1,79E+05	2,35E+05	2,05E+05	1,03E+05	3,80E+01	0,00E+00	2,40E+05	6,40E+01	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	3,32E+00	3,76E+00
27	D	5,686	14,17	7,53E+04	4,09E+05	4,03E+04	5,04E+04	1,20E+01	0,00E+00	3,43E+05	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	4,36E+02	2,00E+00	3,90E+00
28	S	5,850	19,34	8,51E+05	7,21E+05	3,31E+02	5,13E+05	1,38E+05	4,20E+03	4,35E+03	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,70E+00
29	SB	6,081	22,28	3,62E+05	1,78E+05	5,68E+03	3,94E+05	0,00E+00	0,00E+00	1,75E+03	P	0,00E+00	N	N	0,00E+00	2,78E+03	0,00E+00	5,40E+00
30	D	5,892	25,79	3,97E+04	9,43E+05	1,87E+02	1,18E+05	1,26E+05	1,70E+04	3,15E+03	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,15E+00
31	S	6,043	13,96	7,30E+03	9,90E+02	4,40E+03	3,92E+03	0,00E+00	2,00E+01	2,95E+03	P	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
32	A	5,786	14,57	8,69E+04	7,46E+03	4,90E+03	7,21E+04	0,00E+00	5,30E+02	9,90E+03	9,00E+01	0,00E+00	N	N	0,00E+00	2,60E+01	0,00E+00	2,85E+00
33	M	5,673	13,36	8,21E+04	7,00E+03	5,76E+02	1,09E+04	0,00E+00	5,00E+01	5,85E+03	P	0,00E+00	N	N	0,00E+00	6,00E+01	0,00E+00	3,00E+00
34	S	5,823	12,75	1,53E+05	7,94E+04	0,00E+00	1,72E+05	4,01E+04	3,14E+03	1,16E+05	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	5,00E+01	2,30E+00	3,23E+00
35	A	5,670	22,46	2,85E+06	8,01E+06	2,68E+04	2,64E+06	1,35E+06	2,90E+03	2,48E+05	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	2,00E+00	4,21E+00
36	M	5,771	12,75	2,56E+06	3,46E+05	0,00E+00	3,79E+05	1,97E+05	5,70E+02	5,50E+04	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,72E+00
37	S	6,176	27,55	3,04E+05	7,40E+04	4,69E+03	2,42E+06	1,67E+04	2,70E+02	7,28E+04	1,59E+02	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	2,48E+00	4,09E+00
38	S	6,066	24,62	3,80E+05	1,54E+05	4,58E+04	7,23E+05	3,10E+04	2,50E+02	1,41E+05	6,00E+01	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	2,00E+00	4,45E+00
39	S	6,286	28,14	1,37E+05	9,68E+04	1,38E+03	3,86E+05	8,45E+02	1,40E+02	3,32E+04	2,10E+02	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,90E+00
40	R	6,291	17,11	1,40E+05	2,97E+05	4,77E+02	6,04E+05	4,52E+03	1,70E+02	4,10E+03	4,05E+02	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,36E+00
41	Pr	6,275	17,22	4,82E+05	4,25E+05	7,50E+02	1,15E+06	7,52E+04	1,90E+02	8,45E+03	1,73E+03	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,72E+00
42	S	6,177	15,24	7,02E+05	3,86E+05	1,37E+04	1,22E+07	2,17E+04	0,00E+00	1,10E+05	1,48E+02	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,62E+00
43	A	5,866	19,34	1,04E+07	7,31E+05	2,00E+04	2,62E+07	2,95E+04	0,00E+00	6,66E+05	3,24E+02	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,91E+00
44	S	6,165	14,73	2,56E+05	2,68E+05	5,56E+03	1,29E+05	2,01E+05	0,00E+00	2,80E+04	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,09E+00
45	S	6,180	16,43	5,53E+07	9,10E+04	2,57E+03	9,77E+04	8,67E+05	3,30E+02	1,75E+04	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,49E+00
46	S	6,151	15,30	9,76E+03	3,62E+03	2,99E+03	4,32E+03	3,96E+02	0,00E+00	1,60E+04	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	2,35E+02	2,48E+00	4,33E+00
47	M	5,878	11,90	8,19E+04	1,73E+05	6,35E+02	8,13E+04	1,06E+03	0,00E+00	7,10E+01	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,34E+00
48	Ro	5,716	14,73	3,23E+04	1,05E+04	1,08E+03	1,70E+04	9,12E+02	0,00E+00	1,03E+04	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,83E+00
49	S	6,328	10,32	1,33E+05	1,17E+05	1,20E+04	1,17E+05	6,62E+04	0,00E+00	2,16E+05	P	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+00	4,06E+00
50	A	6,100	13,36	1,46E+06	3,50E+04	1,49E+05	2,07E+05	3,20E+05	3,65E+03	1,99E+06	1,44E+02	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	3,23E+00	3,67E+00
51	M	6,376	10,93	2,03E+04	2,32E+06	2,30E+03	9,40E+03	8,19E+03	8,00E+01	3,83E+04	2,00E+01	P	N	N	0,00E+00	0,00E+00	2,70E+00	3,76E+00
52	S	6,223	14,66	7,82E+04	7,24E+04	0,00E+00	1,59E+06	3,85E+04	1,62E+03	1,35E+05	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+00	3,51E+00
53	M	5,618	14,07	1,72E+05	8,66E+03	1,89E+03	5,54E+05	3,58E+03	3,00E+01	4,57E+04	0,00E+00	0,00E+00	N	N	1,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,30E+00
54	R	6,332	12,90	3,32E+04	1,23E+05	0,00E+00	7,20E+03	6,24E+04	5,70E+02	2,85E+05	2,40E+01	P	N	N	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,10E+00
55	A	5,825	16,41	1,21E+05	4,28E+05	0,00E+00	1,29E+05	3,34E+03	7,00E+01	2,94E+05	1,40E+01	P	N	N	1,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,90E+00
56	S	6,132	14,07	1,60E+03	2,44E+03	1,30E+02	1,45E+03	1,60E+03	0,00E+00	1,00E+03	0,00E+00	0,00E+00	N	N	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,93E+00
57	R	6,401	11,1															

Resumo

Em Portugal, nos últimos anos têm aumentado o número de restaurantes tradicionais japoneses. Estes restaurantes podem revelar algumas questões de segurança alimentar caso os planos de HACCP não sejam bem delineados e as boas práticas de higiene não sejam devidamente implementadas e executadas.

O pescado fresco é muito susceptível a deterioração. O objectivo deste estudo consistiu em conhecer a microbiota deteriorativa e patogénica e algumas características físico-químicas das refeições de *Sashimi* servidas em diversos restaurantes no Norte de Portugal, avaliando a sua qualidade e segurança sanitária para o consumidor.

Neste estudo foi realizada a recolha de 61 refeições de *Sashimi* em 23 restaurantes tradicionais japoneses do Norte do país. Foram efectuadas as determinações microbiológicas de micro-organismos mesófilos e psicotróficos, *Enterobacteriaceae*, Bactérias do ácido láctico, *Pseudomonas* spp., *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, Coliformes totais, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Clostridium* spp., *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Vibrio* spp. e Bolores) e físico-químicas (pH e ABVT).. Os índices químicos revelaram um bom grau de frescura do pescado utilizado na preparação das refeições de *Sashimi*. Contudo, de acordo com os resultados microbiológicos 64% das 61 refeições analisadas foram classificadas como insatisfatórias. Contribuíram para esta situação, os teores de *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, Bolores, Mesófilos, *Bacillus cereus* e Leveduras. Numa amostra detectou-se presença de *Listeria* spp., não se tendo contudo detetado *Listeria monocytogenes*. Os resultados obtidos com este trabalho são indicativos de falhas de higiene na preparação das refeições de *Sashimi*.

Neste trabalho foram ainda realizados inquéritos aos responsáveis de 23 restaurantes em estudo, dos quais apenas 16 se mostraram disponíveis para responder. Das várias questões efetuadas, destacamos a referência às vantagens na utilização de pescado fresco, cujos inquiridos referiram preferir a sua utilização em detrimento do pescado congelado, pois consideram que o pescado fresco apresenta um melhor sabor, qualidade, textura e cor. Ao nível do sistema de HACCP consideram que o ponto de Controlo Crítico é a refrigeração com 47% das respostas, tendo-se concluído que 35% dos inquiridos não sabem qual é o PCC e, em alguns casos, até nem o que é o plano de

HACCP. Este facto revela a necessidade de implementação e melhoria nos sistemas de autocontrolo nestes tipos de estabelecimentos de forma a salvaguardar a segurança das refeições de pescado cru para o consumidor.

Palavras-chave: *Sashimi*, Pescado cru, Segurança alimentar, Análises microbiológicas, HACCP.

Abstract

The number of traditional Japanese restaurants has increased greatly in Portugal in recent years. These restaurants not only reveal some food safety issues related to HACCP plans if not well defined but also to improperly implemented and enforced healthy hygienic practices.

Seeing that fresh fish is very likely to decay quickly, the aim of this study was to identify both microbiota and some physicochemical properties in the *Sashimi* meals served at several restaurants in the north of Portugal and assess the health and safety for consumers.

This study examined sixt-one *Sashimi* meals served at twenty-three traditional Japanese restaurants in the north of the country. Microbiological determinations were performed such as physicochemical properties, deteriorative and pathogenic microbes. Chemical indices (pH and TVB-N) revealed a good degree of freshness in the fish used when preparing *Sashimi* meals. However, according to the microbiological results, 64% of the sixty-one meals analyzed were classified as unsatisfactory. *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus Aureus*, *Bacillus Cereus*, mesophilic, moulds and yeasts contributed to this analysis. One sample detected *Listeria* sp. whose results are indicative of hygiene problems in the preparation of *Sashimi* meals.

The study established that only 16 out of the 23 restaurants reviewed were available to respond to this survey. Despite the disadvantages of using fresh fish, restaurant officials prefer its use in detriment to frozen fish since fresh represents better quality in flavour, texture, and colour. The HACCP considers that the critical control point relates to chilling with 47% of responses, thus concluding that 35% of respondents do not know what PCC is and in some cases, they do not know what the HACCP plan is.

Keywords: *Sashimi*, raw fish, food security, microbiological analysis, HACCP