

SANDY JANE CURADO ALEGRIA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE
MICROBIOLÓGICA DE PEÇAS DE *SUSHI*
PRONTAS PARA CONSUMO**

Orientadora: Professora Doutora Sónia Catarina da Silva Ramos

Coorientadora: Dra. Rosália Furtado

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2020

SANDY JANE CURADO ALEGRIA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE
MICROBIOLÓGICA DE PEÇAS DE *SUSHI*
PRONTAS PARA CONSUMO**

Dissertação defendida em provas públicas no dia 12 de março de 2020 para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no Curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, com o Despacho de Nomeação de Júri nº90/2020 com a seguinte composição:

Presidente: Prof.^a Doutora Laurentina Pedroso

Agente: Prof.^a Doutora Isabel Santos

Orientadora: Prof.^a Doutora Sónia Ramos

Coorientadora: Dra. Rosália Furtado

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2020

Agradecimentos

Este trabalho é o resultado de uma longa caminhada, que não seria possível sem a contribuição e o apoio das instituições por onde passei, e de várias pessoas, a quem gostaria de expressar os meus mais sinceros agradecimentos:

À Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias e à Faculdade de Medicina Veterinária, pela bolsa de investigação que ajudou no financiamento do presente trabalho, e pela possibilidade de frequentar este curso, sempre com o excelente ensino ao longo de todo este percurso.

Ao Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, pela possibilidade de realizar o meu estágio e componente prática deste trabalho.

À Prof. Doutora Sónia Ramos, por me ter aceitado como sua orientanda, pelos conselhos, disponibilidade, paciência e por todo o apoio prestado ao longo da realização deste trabalho.

À Prof. Doutora Isabel Santos pelo seu profissionalismo e dedicação como docente, que me levou a ter interesse e gosto por esta área, e por todo o apoio prestado.

À Dra. Rosália Furtado, minha orientadora externa, pela orientação, apoio e incentivo ao longo deste trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, em especial à Anabela Coelho, à Eng.^a Cristina Belo Correia, à Maria João e à Silvia Marcos por me terem recebido tão bem e por todos os conhecimentos transmitidos ao longo do meu estágio.

A todo o corpo docente do curso de Medicina Veterinária, pelos ensinamentos ao longo destes seis anos de formação e por todo o apoio prestado.

Aos meus colegas de laboratório Matilde e Diogo pelo acolhimento, incentivo e por toda a ajuda prestada.

Às minhas companheiras e amigas, Filipa Ribeiro, Gabriela Manfredini, Raquel Simões, Rita Chaves e Renata Leitão por toda a paciência, ajuda, dedicação, força e amizade.

Às minhas meninas Ana Silva, Denise Melissa, Raquel Fernandes, Cynthia Figueira, Ana Pestana, Marta Santos e Rafaela Rotilio, por toda a cumplicidade e amizade ao longo de toda esta jornada.

Aos meus Pais, que me fizeram querer ser sempre mais e melhor, por todo o amor, compreensão, e por me terem ajudado a tornar este sonho real.

A toda a minha família, por todo o apoio, compreensão e paciência nos momentos mais difíceis.

Ao meu Gui pelo seu amor incondicional e companhia nas longas horas de estudo e de trabalho.

Ao meu Tiago por todo o amor, carinho e dedicação.

Resumo

O *sushi*, prato tradicional japonês cada vez mais consumido em Portugal, é geralmente preparado à base de arroz acidificado com vinagre e ingredientes crus, como pedaços de peixe, mariscos, frutos, e vegetais colocados sobre o arroz moldado ou embrulhados com o arroz em algas marinhas (*nori*). Como contém componentes perecíveis crus e muito manipulados, a qualidade microbiológica do *sushi* vai depender da qualidade microbiológica de cada ingrediente, do cumprimento rigoroso das boas práticas de higiene e de fabrico, assim como do prazo de vida útil.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de refeições de *sushi* prontas para consumo, adquiridas em dois estabelecimentos comerciais (1 restaurante e 1 hipermercado) na região de Lisboa, na modalidade de *take-away*.

Foram recolhidas 62 amostras, e em cada amostra foram efetuados ensaios para contagem de microrganismos a 30 °C, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, Estafilococos coagulase positiva, *Bacillus cereus* e para pesquisa de microrganismos patogénicos, como: *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. vulnificus*. Uma avaliação global das 62 amostras, revelou que em 48,4% (30/62) os resultados analíticos foram interpretados como Não Satisfatórios, em 35,5% (22/62) Questionáveis e em apenas 16,1% (10/62) foram considerados Satisfatórios, não tendo sido detetada a presença de microrganismos patogénicos em nenhuma das amostras. Contudo, no decurso da pesquisa de *Vibrio* spp. foi identificada a presença de espécies de *Aeromonas*, nomeadamente *A. caviae* e *A. hydrophila*.

O elevado número de amostras classificadas com um nível de qualidade microbiológica “Não Satisfatório” e “Questionável” evidência a necessidade de rever as boas práticas de higiene, bem como a qualidade higiénica dos ingredientes utilizados de forma a obter um produto final com um nível de qualidade Satisfatório.

O consumo destes produtos deverá ser evitado por populações pertencentes a grupos de risco, como indivíduos cujo sistema imunitário se encontre comprometido, entre os quais grávidas, crianças e idosos.

Palavras chave: *Sushi*, microrganismos patogénicos, boas práticas, segurança alimentar.

Abstract

Sushi, is a traditional Japanese dish increasingly consumed in Portugal, is usually prepared from vinegar-acidified rice and raw ingredients such as fish pieces, shellfish, fruits, and vegetables placed on molded rice or wrapped with seaweed rice (*nori*). As it contains raw and highly manipulated perishable components, the microbiological quality of *sushi* depends on the microbiological quality of each ingredient and the strict compliance to good hygiene and manufacturing practices, as his shelf life.

The objective of this work was to evaluate the microbiological quality of ready-to-eat *sushi* meals, acquired in two commercial establishments (1 restaurant and 1 hypermarket) in the Lisbon region, in the take-away modality.

Sixty-two samples were collected and analyzed for the microorganism count at 30 °C, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, Coagulase positive *Staphylococci*, *Bacillus cereus* and for pathogenic microorganisms such as *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae* and *V. vulnificus*. A general analysis of the 62 samples revealed that in 48,4% (30/62) the analytical results were interpreted as Not Satisfactory, in 35,5% (22/62) Questionable, and only 16,1% (10/62) were considered Satisfactory. No pathogenic microorganism was detected in the samples, however, during the *Vibrio* spp. survey the presence of *Aeromonas* species, namely *A. caviae* and *A. hydrophila*, was identified.

The high number of samples classified with a level of microbiological quality “Not Satisfactory” and “Questionable” evidences the need to review the good hygienic practices, as well as the hygienical quality of the ingredients used to obtain a final product with a Satisfactory quality level.

Consumption of these products should be avoided by populations belonging to risk groups, such as, individuals whose immune system is compromised, including pregnant women, children and the older people.

Keywords: *Sushi*, pathogenic microorganisms, good practices, food safety.

Résumé

Le *sushi*, est un plat japonais traditionnel de plus en plus consommé au Portugal, est généralement préparé avec du riz acidifié au vinaigre et des ingrédients crus, comme des morceaux de poisson, des fruits de mer, des fruits et des légumes placés sur du riz moulu ou enveloppés sur le riz dans des algues marine (*nori*). Comme il contient des ingrédients périssables crus et beaucoup manipulés, la qualité microbiologique du *sushi* dépendra de la qualité microbiologique de chaque ingrédient, du respect des règles des bonnes pratiques d'hygiène et fabrication, ainsi que de la durée de conservation.

Ce travail visé évaluer la qualité microbiologique de repas de *sushi* prêts à la consommation acquis sur deux surfaces commerciales (1 restaurant et 1 hypermarché) dans la région de Lisbonne en mode à emporter.

Soixante-deux échantillons ont été collectés, et dans chaque échantillon, des analyses microbiologiques ont été effectuées afin de compter les micro-organismes à 30 °C, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Staphylococci* coagulase positive, *Bacillus cereus* et pour la recherche de micro-organismes pathogènes, tels que: *Salmonella* spp. *Listeria monocytogenes* et *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae* et *V. vulnificus*. Une analyse générale des 62 échantillons a révélé que dans 48,4% (30/62) les résultats analytiques étaient interprétés comme Non Satisfaisants, dans 35,5% (22/62) Douteuse et dans seulement 16,1% (10/62) comme Satisfaisante, la présence de microorganismes pathogènes n'a été détectée dans aucun des échantillons. Cependant, au cours de la recherche de *Vibrio* spp., la présence d'espèces de *Aeromonas* ont été identifiées, à savoir *A. caviae* et *A. hydrophila*.

Le nombre élevé d'échantillons classés à un niveau de qualité microbiologique "Non Satisfaisant" et "Discutable" témoigne de la nécessité de revoir les bonnes pratiques d'hygiène, ainsi que la qualité hygiénique des ingrédients utilisés afin d'obtenir un produit final avec un niveau de qualité Satisfaisant.

La consommation de ces produits doit être évitée par les populations appartenant à des groupes à risque, comme les individus dont le système immunitaire est compromis, notamment femmes enceintes, enfants et personnes âgées.

Mots-clés: *sushi*, micro-organismes pathogènes, bonnes pratiques, sécurité alimentaire.

Comunicações:

^aAlegria, S., ^bBarreira, M. J., ^bCoelho, A., ^bMarcos, S., ^bSaraiva, M., ^bFurtado, R., ^aRamos, S. (2019). “Avaliação da qualidade microbiológica de peças de *sushi* prontas para consumo”. *Poster* apresentado no 1º Simpósio INIAV para a Segurança Alimentar Rumo à Alimentação do Futuro, que decorreu em Vila do Conde, Auditório Municipal Vila do Conde, a 28 de novembro de 2019.

^aAlegria, S., ^bBarreira, M. J., ^bCoelho, A., ^bMarcos, S., ^aSantos, M. I., ^aPedroso, L., ^bFurtado, R., ^aRamos, S. (2020). “Avaliação da qualidade microbiológica de peças de *sushi* na região de Lisboa”. *Poster* apresentado no XVI Congresso Internacional Veterinário Montenegro, que decorreu em Santa Maria da Feira, no Europarque, de 20 a 22 de fevereiro de 2020.





LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AC: Microrganismos aeróbios mesófilos

AJT: Arroz Japonês Temperado com vinagre, vinho de arroz, açúcar e sal

ALOA: Agar *Listeria* segundo Ottaviani & Agosti

Amd: Alteração, do inglês “*Amendment*”

APA: Água Peptonada Alcalina

ASAE: Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

ASP: Intoxicação do tipo amnésico por marisco, do inglês “*Amnesic Shellfish Poisoning*”

aw: Atividade da água

BC: *Bacillus cereus*

BFR: Instituto Federal Alemão para Avaliação de Riscos, do alemão “*Bundesinstitut für Riskobewertung*”

BPW: Água Peptonada Tamponada, do inglês “*Buffered Peptone Water*”

°C: Grau Célsius

CAC: *Codex Alimentarius Commission*

CAST: Conselho de Ciência e Tecnologia Agrícola “*Council for Agricultural Science and Technology*”

CDC: Centros de Controle e Prevenção de Doenças, do inglês “*Centers for Disease Control and Prevention*”

CE: Comissão Europeia

DAEC: Grupo Patogénico de *Escherichia coli* – Difusamente Aderente

Dp: Desvio padrão

DSP: Intoxicação do tipo diarreica por marisco, do inglês “*Diarrhetic Shellfish Poisoning*”

EAEC: Grupo Patogénico de *Escherichia coli* – Enteroagregativo

EB: *Enterobacteriaceae*

EC: *Escherichia coli*

EN: Norma Europeia

EFSA: Autoridade Europeia de Segurança Alimentar, do inglês “*European Food Safety Authority*”

EHEC: Grupo Patogénico de *Escherichia coli* – Enterohemorrágico

EIEC: Grupo Patogénico de *Escherichia coli* – Enteroinvasiva

ELFA: Ensaio imunológico com revelação fluorescente, do inglês “*Enzyme Linked Fluorescent Assay*”

EPEC: Grupo Patogénico de *Escherichia coli* – Enteropatogénica

ETEC: Grupo Patogénico de *Escherichia coli* – Enterotoxinogénica

***Et al.*:** E outros, da locução latina “*et alli*”

EUA: Estados Unidos da América

FAO: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, do Inglês “*Food and Agriculture Organization of the United Nations*”

FDA: Administração de alimentos e medicamentos do Inglês, “*Food and Drug Administration*”

FEHD: Departamento de Higiene Alimentar e Ambiental do Inglês “*Food Environmental and Hygiene Department*”

g: grama

h: hora

HACCP: Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos, do Inglês “*Hazard Analysis and Critical Control Point*”

Hg: Mercúrio

HPA: Agência de Proteção da Saúde, do Inglês “*Health Protection Agency*”

IEC: Comissão Eletrotécnica Internacional, do inglês “*International Electrotechnical Commission*”

INSA: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

IPAC: Instituto Português de Acreditação

ISO: Organização Internacional de Normalização, do Inglês “*International Organization for Standardization*”

LMO2: Kit VIDAS *Listeria*

Log: Logaritmo de base 10

mm: Milímetros

MALDI-TOF: Dessorção Ionização Assistida por Matriz - Tempo de Voo, do inglês “*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*”

Máx: Máximo

MeHg: Metilmercúrio

Min: Mínimo

mg/kg: Miligramas por quilogramas

mL: Mililitro

MOPS: 3-(N-morfolino) propanesulfónico sal de sódio

n: número de amostras

NaCl: Cloreto de sódio

nm: nanómetro

NMP: Número Mais Provável

NP: Norma Portuguesa

NSP: Intoxicação do tipo neurotóxico por marisco, do inglês “*Neurotoxic Shellfish Poisoning*”

NSW: Autoridade Alimentar de Nova Gales do Sul, do inglês “*New South Wales, Food Authority*”

OCP: Pesticidas organoclorados

PAH: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

PBDE: Difeniléteres polibromados

PCB: Bifenilos policlorados

pH: Potencial de Hidrogénio

POP: Poluentes Orgânicos Persistentes

PSP: Intoxicação do tipo paralisante por marisco, do inglês “*Paralytic Shellfish Poisoning*”

rpm: Rotações por Minuto

SLM: Kit VIDAS *Salmonella*

SPR: Cone kit VIDAS

SPSS: Pacote Estatístico para as Ciências Sociais, do inglês “*Statistical Package for the Social Sciences*”

STA: Estafilococos coagulase positiva

STEC: Grupo Patogénico de *Escherichia coli* – toxina *Shiga-like*

SX2: Caldo de enriquecimento seletivo para *Salmonella*

TCBS: Ágar de tiosulfato, citrato, bile e sacarose, do Inglês “*Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose Agar*”

TS: Triptona Sal

TSA: Gelose Triplicase Soja, do Inglês “*Agar Trypticase Soja*”

TSI: Meio Tríplice Açúcar Ferro, do Inglês “*Triple Sugar Iron*”

µL: Microlitro

µm: Micrómetro

ufc: Unidades formadoras de colónias

ufc/g: Unidades formadoras de colónias por grama

VCA: Agar Cromogénico para *Vibrio*, do Inglês “*Vibrio Chromogenic Agar*”

VHA: Vírus da Hepatite A

VMA: Valor Máximo Admissível

VMR: Valor Máximo de Referência

VTEC: Grupo Patogénico de *Escherichia coli* – produtor de toxinas vero

WHO: Organização Mundial de Saúde, do inglês “*World Health Organization*”

XLD: Agar xilose lisina desoxicolato, do Inglês “*Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar*”

%: Por cento

<: Inferior

>: Superior

≥: Superior ou igual

≤: Inferior ou igual

ÍNDICE

Breve descrição das atividades desenvolvidas no decorrer deste trabalho.....	21
1. Introdução	22
2. <i>Sushi</i>	23
2.1. Etapas envolvidas na preparação de <i>sushi</i>	23
2.1.1. Compra	24
2.1.2. Armazenamento	25
2.1.3 Preparação	25
2.1.4 Expedição/Exposição	27
2.2. Variedades de <i>sushi</i>	28
2.2.1. <i>Hoso maki</i>	28
2.2.2. <i>Nigui</i> ri	29
2.2.3. <i>Futo maki</i>	29
2.2.4. <i>Uramaki</i>	30
2.2.5. <i>Gunkan maki</i>	30
2.2.6. <i>Temaki</i>	30
2.2.7. <i>Sashimi</i>	31
2.2.8. <i>Chirashi sushi</i>	31
2.3. O <i>sushi</i> de fusão	31
2.4. <i>Sushi</i> e os seus benefícios nutricionais	32
2.4.1. Pescado.....	32
2.4.2. Arroz.....	33
2.4.3. Algas marinhas.....	33
2.4.4. Frutos e vegetais.....	33
2.4.5. Outros ingredientes	34
2.5. <i>Sushi</i> e os seus malefícios nutricionais	34
3. Doenças de origem alimentar	34
4. Principais perigos veiculados através do consumo de <i>sushi</i>	36
4.1. Perigos físicos	36
4.2. Perigos químicos.....	37
4.2.1. Biotoxinas marinhas.....	37

4.2.2. Histamina	39
4.2.3. Metais pesados	40
4.2.4. Micotoxinas	41
4.2.5. Medicamentos de uso veterinário	42
4.2.6. Poluentes orgânicos persistentes	43
4.3. Perigos biológicos	43
4.3.1. Vírus	44
4.3.2. Parasitas	45
4.3.3. Bactérias	46
4.3.3.1. <i>Salmonella</i> spp.	47
4.3.3.2. Patótipos de <i>Escherichia coli</i>	48
4.3.3.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	49
4.3.3.4. <i>Bacillus cereus</i>	49
4.3.3.5. <i>Listeria monocytogenes</i>	50
4.3.3.6. <i>Vibrio</i> spp.	51
5. Microrganismos indicadores	52
5.1. Microrganismos aeróbios mesófilos totais	52
5.2. <i>Enterobacteriaceae</i>	53
5.3. <i>Escherichia coli</i>	53
6. O <i>sushi</i> como fonte de infecção ou intoxicação alimentar	53
7. Objetivos	55
8. Materiais	56
8.1. Amostragem	56
8.2. Análises microbiológicas realizadas:	57
8.3. Meios de cultura e reagentes utilizados	57
8.3.1. Meios utilizados como diluentes e pré-enriquecimento	57
8.3.1.1. Água Peptonada Tamponada	57
8.3.1.2. Caldo <i>Half-Fraser</i>	58
8.3.1.3. Água Peptonada Alcalina	58
8.3.1.4. Triptona Sal	58
8.3.2. Meios de enriquecimento seletivo	58

8.3.2.1. Caldo SX2	58
8.3.2.2. Caldo <i>Fraser</i>	59
8.3.3. Meios de cultura utilizados no equipamento TEMPO®	59
8.3.4. Meios sólidos	60
8.3.4.1. Xylose-Lysine-Desoxycholate	60
8.3.4.2. IBISA® Agar	60
8.3.4.3. <i>Triple Sugar Iron</i>	60
8.3.4.4. Agar <i>Listeria</i> segundo Ottaviani & Agosti	60
8.3.4.5. Oxford Agar	61
8.3.4.6. <i>Tryptone Soya Agar</i>	61
8.3.4.7. <i>Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose Agar</i> (TCBS).....	61
8.3.4.8. <i>Vibrio Chromogenic Agar</i>	61
8.4. Descrição dos sistemas automatizados	62
8.4.1. Equipamentos do sistema TEMPO®	62
8.4.2. Sistema VIDAS®	63
8.4.3. Equipamento VITEK® MS.....	64
8.5. Materiais utilizados em cada pesquisa:.....	64
8.5.1. Meios de cultura, reagentes e materiais utilizados na contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Estafilococos</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Bacillus cereus</i> :	64
8.5.2. Meios de cultura, reagentes e materiais utilizados na pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.:	65
8.5.3. Meios de cultura, reagentes e materiais utilizados na pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> :	65
8.5.4. Reagentes e meios de cultura utilizados na pesquisa de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio alginolyticus</i> e <i>Vibrio vulnificus</i> :	66
9. Metodologia.....	66
9.1. Metodologia realizada na preparação das amostras para análise.....	66
9.2. Metodologia realizada na preparação das diluições decimais:	67
9.3. Metodologia realizada na contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais (AC), <i>Enterobacteriaceae</i> (EB), <i>Escherichia coli</i> (EC), <i>Estafilococos</i> (STA) e <i>Bacillus cereus</i> (BC):	68
9.4. Metodologia realizada na pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	70

9.5. Metodologia realizada na pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> :	71
9.6. Metodologia realizada na pesquisa de <i>Vibrio</i> spp.:	72
9.7. Metodologia para classificação das amostras segundo os critérios microbiológicos: ...	74
9.8. Metodologia utilizada na análise dos resultados obtidos.....	75
10. Apresentação e discussão dos resultados	76
10.1. Resultados obtidos nas análises microbiológicas por parâmetro microbiológico analisado	76
10.2. Avaliação da qualidade microbiológica por parâmetro microbiológico analisado.....	77
10.2.1. Microrganismos aeróbios mesófilos	77
10.2.2. <i>Enterobacteriaceae</i>	79
10.2.3. <i>Escherichia coli</i>	81
10.2.4. Estafilococos coagulase positiva.....	82
10.2.5. <i>Bacillus cereus</i>	83
10.2.6. Correlação entre os microrganismos em estudo.....	84
10.2.7. <i>Salmonella</i> spp.	85
10.2.8. <i>Listeria monocytogenes</i>	86
10.2.9. <i>Vibrio</i> spp.	87
10.3. Avaliação da qualidade microbiológica por variedade de peixe analisada	88
10.4. Resultados obtidos nas análises microbiológicas realizadas por variedade de peixe ..	89
10.5. Distribuição das amostras classificadas com nível microbiológico Não Satisfatório por variedade de peixe e por superfície comercial.....	92
10.5.1. Parâmetros envolvidos na classificação Não Satisfatório das amostras	93
10.7. Avaliação da qualidade microbiológica do total de amostras analisadas	96
Conclusão	98
Bibliografia:.....	100

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Análise de perigos associados à produção de <i>sushi</i> e medidas de controlo.....	28
Tabela 2. Principais vírus presentes no pescado e sintomatologia associada.....	44
Tabela 3. Infecções parasitárias adquiridas pelo consumo de pescado cru.....	45
Tabela 4. Nº de amostras de cada variedade de pescado analisadas e restantes ingredientes que compunham as amostras.....	56
Tabela 5. Diluentes, volumes e peso da amostra utilizado em cada ensaio.....	67
Tabela 6. Temperatura e período de incubação de cada carta segundo o microrganismo em análise.....	69
Tabela 7. Interpretação dos resultados no meio TCBS com base na morfologia das colónias.....	74
Tabela 8. Interpretação dos resultados no meio VCA com base na morfologia das colónias...	74
Tabela 9. “Valores-guia INSA” - microrganismos indicadores de higiene e alteração em alimentos prontos para consumo. Resultados interpretados segundo a contagem de ufc/g em 25 g de amostra.....	75
Tabela 10. “Valores-guia INSA” - microrganismos patogénicos e toxinas em alimentos prontos para consumo. Resultados interpretados segundo a contagem de ufc/g ou a pesquisa em 25 g de amostra.....	75
Tabela 11. Médias de contagem expressos em log ufc/g, desvio padrão, e valores mínimos e máximos obtidos, por parâmetro microbiológico analisado, no total de amostras e por superfície comercial.....	76
Tabela 12. Correlação entre os microrganismos.....	85
Tabela 13. Médias de contagem expressos em log ufc/g, desvio padrão, e valores mínimos e máximos obtidos, por parâmetro microbiológico analisado, por variedade de peixe, e por superfície comercial.....	90
Tabela 14. Resultados estatísticos obtidos após aplicado o teste de Kruscall-Walis, na comparação da contagem dos microrganismos em estudo, entre as variedades de peixe analisadas, dentro de cada superfície comercial.....	92
Tabela 15. Distribuição das amostras classificadas com nível microbiológico Não Satisfatório em cada variedade de peixe, por superfície comercial, e os parâmetros que deram origem a essa classificação.....	94

Tabela 16. Resultados estatísticos obtidos após aplicado o teste de Mann-Withney, para comparação das contagens por parâmetro, entre as superfícies comerciais, para a mesma variedade de peixe analisada.....95

Tabela 17. Análises estatísticas referentes ao cruzamento da apreciação dos microrganismos e da superfície comercial, na amostra total e em cada variedade de peixe.....96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma de produção de <i>sushi</i> e <i>sashimi</i>	24
Figura 2. Aspeto geral do <i>Hoso maki</i>	29
Figura 3. Aspeto geral do <i>Niguri</i>	29
Figura 4. Aspeto geral do <i>Futo maki</i>	29
Figura 5. Aspeto geral do <i>Uramaki</i>	30
Figura 6. Aspeto geral do <i>Gunkan maki</i>	30
Figura 7. Aspeto geral do <i>Temaki</i>	30
Figura 8. Aspeto geral de <i>Sashimi</i>	31
Figura 9. Aspeto geral do <i>Chirashi sushi</i>	31
Figura 10. Representação dos equipamentos do sistema TEMPO®.....	63
Figura 11. Ilustração esquemática das diluições decimais sucessivas.....	68
Figura 12. Ilustração esquemática do procedimento para a pesquisa de AC, EB, EC, STA e BC através do método automatizado TEMPO®.....	69
Figura 13. Ilustração esquemática do procedimento para a pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. através do método imunoenzimático VIDAS®.....	71
Figura 14. Ilustração esquemática do procedimento para a pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> através do método imunoenzimático VIDAS®.....	72
Figura 15. Ilustração esquemática do procedimento para a pesquisa de <i>Vibrio</i> spp.....	73

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição das amostras de <i>sushi</i> quanto ao nível de qualidade microbiológica, relativamente à contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, por superfície comercial...	77
Gráfico 2. Distribuição das amostras de <i>sushi</i> quanto ao nível de qualidade microbiológica, relativamente à contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> , por superfície comercial.....	79
Gráfico 3. Distribuição das amostras de <i>sushi</i> quanto ao nível de qualidade microbiológica, relativamente à contagem de <i>Estafilococos</i> coagulase positiva, por superfície comercial.....	82
Gráfico 4. Distribuição das amostras de <i>sushi</i> , quanto ao nível de qualidade microbiológica, por variedade de peixe.....	89
Gráfico 5. Distribuição das amostras de <i>sushi</i> classificadas com nível microbiológico Não Satisfatório, por variedade de peixe e por superfície comercial.....	93
Gráfico 6. Distribuição amostras de <i>sushi</i> , quanto à sua qualidade microbiológica no total (62) de amostras analisadas, e por superfície comercial (31 Hipermercado/31 Restaurante).....	97

Breve descrição das atividades desenvolvidas no decorrer deste trabalho

O trabalho prático que serviu de base à realização da presente dissertação de mestrado, decorreu de 2 de maio a 28 de junho de 2019, no Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA). Este laboratório possui a maior parte dos seus ensaios acreditados pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC), de acordo com o referencial normativo NP EN ISO/IEC 17025:2018 (NP EN ISO/IEC 17025, 2018). Realiza serviços na área de Segurança Alimentar, para verificação do cumprimento dos pré-requisitos de higienização das superfícies e dos utensílios em contacto com os alimentos por parte dos estabelecimentos, bem como para verificação da qualidade microbiológica das refeições preparadas.

Durante o período de estágio no laboratório, foi possível acompanhar as análises microbiológicas realizadas às amostras recolhidas, desde a pesagem e diluição da amostra inicial, à realização dos ensaios microbiológicos, contagens em placa e ensaios para confirmação/identificação dos microrganismos presentes.

Numa primeira fase, foram realizados ensaios de controlo de qualidade, nomeadamente ensaios em branco, que consistiram na realização de análises microbiológicas com substituição da amostra por água estéril, este ensaio permite averiguar a execução e esterilidade do processo, de modo a detetar contaminações externas durante o procedimento. Foram ainda realizados ensaios aos grupos de alimentos: Grupo I (alimentos totalmente cozinhados), Grupo II (cozinhados/crus) e Grupo III (alimentos totalmente crus) de maneira a garantir um bom desempenho na execução das análises microbiológicas para a presente dissertação.

Numa segunda fase, foi desenvolvido o trabalho analítico do estudo de avaliação da qualidade microbiológica de peças de *sushi* prontas para consumo, onde foram realizados ensaios microbiológicos pelos sistemas automatizados TEMPO® e VIDAS®, e pesquisa de *Vibrio* spp. segundo a norma ISO 21872-1:2017 (ISO 21872-1, 2017).

1. Introdução

As doenças transmitidas pelos alimentos, são um grave problema de saúde pública, principalmente as de origem microbiana que aumentam em todo o mundo, não só em países em desenvolvimento como também em países desenvolvidos (de Queiroz *et al.*, 2019). No mundo morrem anualmente, três milhões de pessoas devido a doenças transmitidas por água e alimentos contaminados (Food And Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2014).

Sendo o *sushi* um alimento bastante perecível, a sua qualidade microbiológica depende de vários fatores como, da qualidade microbiológica inicial de cada ingrediente, do controlo de temperatura durante todas as etapas de produção, e das boas práticas de higiene e segurança alimentar por parte dos manipuladores durante a sua preparação e confeção (Hoel, Jakobsen & Vadstein, 2017).

O número de estabelecimentos que oferece este género alimentício aumentou, e face à sua procura o mercado expandiu-se para pontos mais acessíveis ao consumidor. Já se encontra disponível em hipermercados, para além dos restaurantes especializados em cozinha japonesa como era habitual (de Queiroz *et al.*, 2019). A comercialização de *sushi* por parte dos estabelecimentos na modalidade de *take-away*, aumenta os riscos para a segurança alimentar, pelo facto de o produto permanecer sem controlo de temperatura durante o transporte até ao momento do seu consumo, o que pode favorecer o crescimento de eventuais microrganismos patogénicos existentes (Vidaček & Janči, 2016).

Sendo um prato confeccionado, na sua maioria com pescado cru, e sem qualquer tipo de tratamento térmico, com o intuito de eliminar ou reduzir a carga microbiana presente até níveis aceitáveis, o risco de intoxicação e infeção de origem bacteriana aumenta (Dias, 2018; FAO, 2019). A sua monitorização é de extrema importância, pelos potenciais riscos que pode acarretar à saúde dos consumidores na transmissão de várias doenças de origem alimentar (Liang *et al.*, 2016).

2. *Sushi*

O *sushi* é um prato tradicional japonês confeccionado à base de peixes e mariscos crus, arroz japonês temperado com vinagre, vinho de arroz, açúcar e sal (AJT), e algas marinhas (*nori*). É combinado com outros ingredientes como frutos e vegetais, e acompanhado com pasta de *wasabi*, gengibre e molho de soja (Hoel, Mehli, Bruheim, Vadstein & Jakobsen, 2015).

2.1. Etapas envolvidas na preparação de *sushi*

Para assegurar a higiene de um género alimentício, devem ser cumpridos os princípios gerais de higiene dos alimentos referidos no *Codex Alimentarius*, em conjunto com cada código específico de higiene e diretrizes sobre critérios microbiológicos. É recomendada uma abordagem baseada num sistema de Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (HACCP) (HACCP do inglês “*Hazard Analysis and Critical Control Point*”) em todas as etapas de produção, de modo a melhorar a segurança dos alimentos (Codex Alimentarius Commission [CAC], 2003).

Todas as etapas envolvidas na preparação de *sushi* devem ser realizadas de acordo com os princípios HACCP, devendo os operadores das empresas do setor alimentar cumprir os requisitos gerais de higiene dos géneros alimentícios estabelecidos no Regulamento (CE) nº 852/2004, assim como, as regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal estabelecidas no Regulamento (CE) nº 853/2004 (CAC, 2003; Regulamento (CE) nº 852/2004; Regulamento (CE) nº 853/2004). Na figura 1, e parágrafos seguintes, encontra-se uma breve descrição de cada uma das etapas de preparação de *sushi* e *sashimi*.

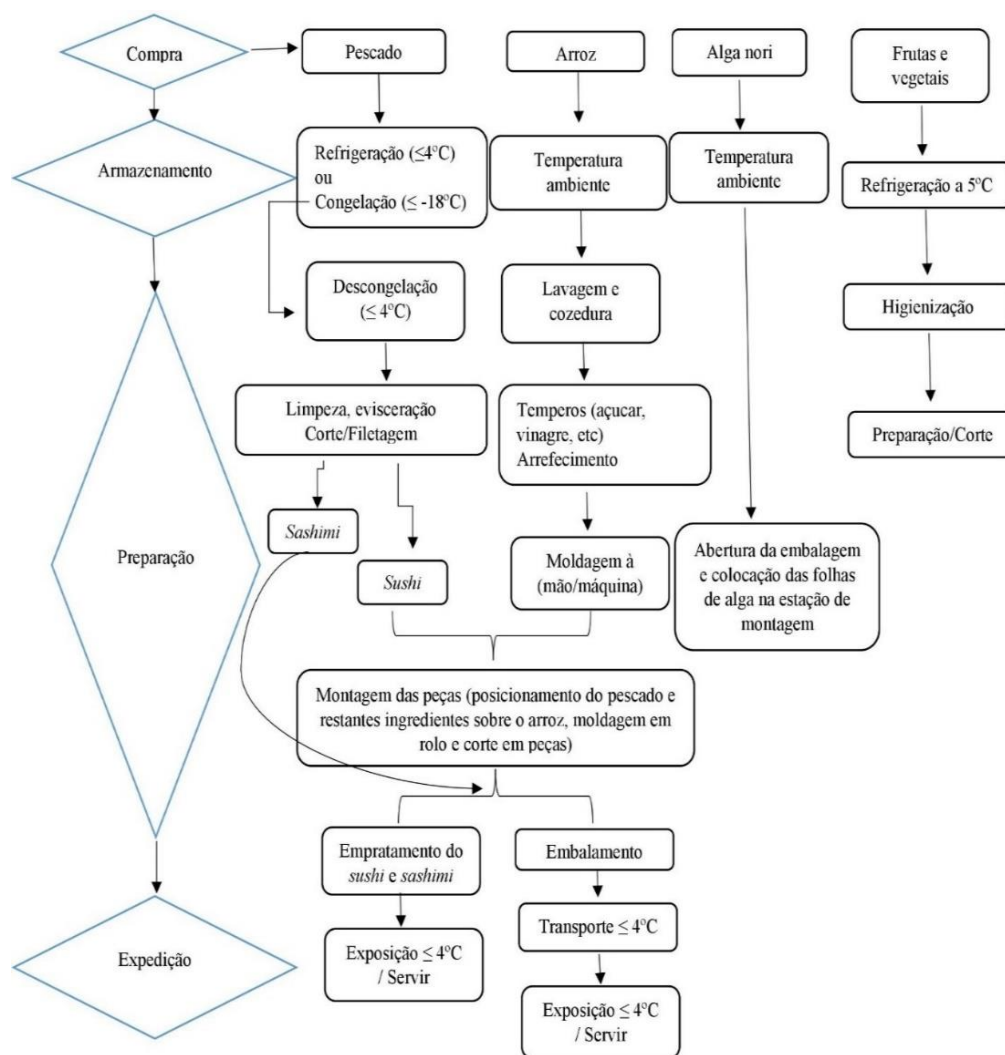


Figura 1 – Fluxograma de produção de *sushi* e *sashimi* (Adaptado de FEHD, 2000 e Prado, Iwatani, Pereira, Gollucke, & Toledo, 2014).

2.1.1. Compra

Na compra dos ingredientes, é de extrema importância que os estabelecimentos adquiram matérias-primas de alta qualidade, a fornecedores de confiança que assegurem a qualidade do produto a ser consumido cru, e com certificado sanitário emitido pela autoridade competente do país (Food and Environmental Hygiene Department [FEHD], 2000). Todos os produtos, devem ser adquiridos a fornecedores que operem segundo o sistema HACCP. Relativamente ao pescado, é importante conhecer a identidade do fornecedor, ter acesso a informações como: o local onde foi capturado, a duração do transporte, a temperatura a que foi mantido durante o transporte, e o meio de transporte utilizado (Garrido, Mobley, Otwell & Schneider, 2004). Na receção de produtos estáveis à temperatura ambiente, como o arroz cru, as folhas de alga, e a *wasabi* em pó, deve verificar-se o estado da embalagem, se esta se encontra

intacta, e armazenar os produtos em local adequado e livre de contaminações (New South Wales, Food Authority [NSW Food Authority], 2007). No caso do arroz, se for adquirido já acidificado e preparado, deverá ser proveniente de um fornecedor certificado, com sistema HACCP implementado, deverão ainda ser disponibilizados registos sobre a sua produção, dados que documentem a sua correta acidificação ($\text{pH} < 4,6$) e ainda a duração e temperatura de armazenamento. O pH deve ser verificado, em caso de não conformidade ($\text{pH} > 4,6$ ou produção $> 8\text{h}$) deverá ser devolvido ao fornecedor. Não esquecendo os demais ingredientes, como os frutos, os vegetais, as algas (*nori*), o vinagre e as especiarias, que deverão igualmente ser provenientes de fornecedores certificados (Garrido *et al.*, 2004; NSW Food Authority, 2007).

2.1.2. Armazenamento

Após a compra, o armazenamento das matérias-primas deve ser feito o mais rápido possível, a temperaturas adequadas, protegidas de possíveis contaminações, e armazenadas de modo a reduzir ou impedir o crescimento de microrganismos. Eventuais falhas no controlo de temperatura podem conduzir a surtos de infeções e intoxicações alimentares (Garrido *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2016).

Os produtos congelados devem ser armazenados a temperatura igual ou inferior a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, até ao dia anterior à sua preparação. Esta temperatura assegura que os microrganismos sejam incapazes de se multiplicarem (FEHD, 2000).

Se refrigerados, os produtos devem ser armazenados entre $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ visto que a maioria dos microrganismos não se multiplica a esta temperatura, embora alguns como *Listeria monocytogenes* e certos microrganismos de deterioração sejam capazes de crescer lentamente, enquanto a atividade enzimática pode continuar a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ portanto, a deterioração dos produtos pode ocorrer a temperaturas de refrigeração (FEHD, 2000).

As matérias-primas e os produtos prontos para consumo, devem ser armazenados e mantidos separadamente, dentro de recipientes, sobre paletes ou estruturas que não absorvam humidade, e que sejam de fácil higienização (Garrido *et al.*, 2004).

2.1.3 Preparação

Os vários ingredientes são cortados manualmente pelo *sushiman* com auxílio de facas, tábuas de corte, ou sobre a própria bancada do *sushibar*, o risco de contaminação cruzada durante a preparação é bastante significativo, principalmente através do contacto direto entre os vários produtos crus e a mão do manipulador, que pode levar à contaminação dos alimentos

com microrganismos patogénicos como: *Staphylococcus aureus*, certos patótipos de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. (FEHD, 2000; Liang *et al.*, 2016). É importante que os utensílios usados sejam de materiais de fácil higienização, que não absorvam humidade, nem apresentem características propícias ao desenvolvimento de microrganismos. Devem ser corretamente higienizados entre a preparação dos diferentes ingredientes, de modo a evitar a contaminação cruzada, principalmente quando se trata de alimentos crus, que posteriormente não sejam sujeitos a tratamento térmico após manipulação. Os manipuladores deverão garantir boas práticas de higiene pessoal, proceder à lavagem das mãos entre as diferentes operações, e sempre que necessário. No caso da utilização de luvas descartáveis, estas devem ser descartadas sempre entre diferentes operações. Manipuladores cujo estado de saúde se encontre comprometido, e que apresentem sintomas como, febre, diarreia, e vômitos não devem realizar a preparação dos alimentos (NSW Food Authority, 2007).

Os produtos congelados, como o peixe e o marisco, devem ser retirados um dia antes da sua preparação, e mantidos a $< 4^{\circ}\text{C}$ durante o processo de descongelação (FEHD, 2000).

O arroz cozido pode ser um alimento potencialmente perigoso, embora a maioria das bactérias sejam inativadas através do processo de cozedura, o arroz cozido fornece um ambiente propício ao crescimento de microrganismos. Os principais microrganismos associados ao arroz no *sushi* são *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, embora possa ser contaminado com outros microrganismos patogénicos através do contacto com os demais ingredientes e a mão do manipulador. Como é geralmente servido à temperatura ambiente, deve ser corretamente acidificado logo após a cozedura, a fim de garantir um $\text{pH} < 4,6$ que iniba o crescimento de microrganismos. O arroz corretamente acidificado pode ser mantido à temperatura ambiente até 8 horas, após esse período deverá ser descartado (Lee & Heacock, 2014).

Os frutos e os vegetais, se não forem corretamente higienizados, podem ser fonte de microrganismos, contaminar o peixe cru, e contribuir para a proliferação de microrganismos patogénicos (Hoel *et al.*, 2017). A contaminação pode ocorrer na pré- ou pós-colheita, pelo contacto com fertilizantes à base de estrume, fezes de animais silvestres, águas de irrigação contaminadas, manipulação e contacto com superfícies contaminadas. Microrganismos como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* e *Bacillus cereus* podem ser facilmente encontrados no solo, enquanto *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica* e *Vibrio cholerae* são exemplos de microrganismos associados a surtos, derivados do consumo de frutos e vegetais contaminados (Beuchat, 2006).

2.1.4 Expedição/Exposição

Com o aumento da procura de *sushi* e atendendo às necessidades do consumidor, este produto começou a ser comercializado embalado e pronto para consumo, como tal, deixou de ser consumido logo após a sua preparação, como ocorria anteriormente, e começou a ter um período de exposição mais alargado, onde medidas de controlo eficazes são cruciais para garantir a segurança do produto (Vidaček & Janči, 2016).

Produtos prontos para consumo, em exposição, devem ser mantidos em expositores refrigerados que assegurem a manutenção a temperatura $\leq 5^{\circ}\text{C}$, protegidos da luz solar direta e de eventuais contaminações, de modo a minimizar o crescimento de microrganismos patogénicos. Os produtos embalados, devem encontrar-se devidamente rotulados, com informações como o modo de conservação e o prazo de validade. O tempo de exposição no ponto de venda não deve ultrapassar as 24 horas, caso o produto não seja adquirido durante esse período deverá ser descartado (Garrido *et al.*, 2004).

De acordo com a NSW Food Authority (2007) se forem seguidas boas práticas de higiene e segurança durante todo o processo, o *sushi* pode ser exibido a temperatura $> 5^{\circ}\text{C}$, durante um período máximo de 4 horas.

Relativamente ao transporte, deve encontrar-se bem higienizado, com controlo de temperatura eficaz, mantendo a temperatura $\leq 4^{\circ}\text{C}$, e protegido de contaminações externas. Devem existir registos que indiquem: a hora em que o *sushi* foi posto em exposição, e a hora de expedição (FEHD, 2000; NSW Food Authority, 2007).

Tal como referido, as várias etapas envolvidas na preparação de *sushi*, podem estar associadas à introdução de microrganismos patogénicos e/ou favorecer o seu crescimento. A segurança dos alimentos é assegurada fundamentalmente, pelo controlo no local de origem da planificação e formulação do produto, e pela adoção de boas práticas de higiene durante a produção, processamento (incluindo a etiquetagem), manipulação, distribuição, armazenamento, venda, preparação e consumo, juntamente com a aplicação de um plano HACCP (CAC, 2003). Na tabela 1 encontram-se resumidos os principais perigos associados às várias etapas de preparação de *sushi* e as respetivas medidas de controlo.

Tabela 1- Análise de perigos associados à produção de *sushi* e medidas de controlo (Adaptado de Lee & Heacock, 2014; Prado *et al.*, 2014 e de Queiroz *et al.*, 2019).

Etapa	Ingrediente	Análise de Perigos	Medidas de Controlo
Receção	Pescado	Biológicos- microrganismos patogénicos Químicos- toxinas, metais pesados, resíduos de medicamentos veterinários	Seleção de fornecedores de confiança; Tempo e temperatura recomendados; Correta higienização das mãos e utensílios.
	Arroz	Biológicos- microrganismos patogénicos Físicos – insetos, pedras	Seleção de fornecedores; Inspeção visual de contaminantes físicos.
	Alga nori	Biológicos- microrganismos de origem	Seleção de fornecedores
	Frutos e vegetais	Biológicos- microrganismos patogénicos, parasitas Químicos- pesticidas	Seleção de fornecedores; Inspeção visual de parasitas.
Armazenamento	Pescado	Biológicos- proliferação de bactérias Químicos- toxinas	Armazenamento a temperatura adequada.
	Arroz	Físicos- insetos	Armazenamento em área limpa e protegida.
	Alga nori	Biológico- proliferação de bactérias e fungos	Armazenamento em área limpa e protegida.
	Frutos e vegetais	Biológico- proliferação de bactérias e fungos	Armazenamento a temperatura adequada.
Manipulação	Pescado	Biológico- microrganismos Químico- toxinas	Controlo de tempo/temperatura; Boas práticas de higiene.
	Arroz	Biológico- microrganismos Químico- toxinas	Controlo de tempo/correta acidificação do arroz após cozedura; Boas práticas de higiene.
	Alga	Biológico- microrganismos Químico- toxinas	Desinfecção da embalagem de origem com álcool a 70%; Boas práticas de higiene.
	Frutos e vegetais	Biológico- microrganismos Químico- toxinas	Correta higienização com solução desinfetante; Boas práticas de higiene.
Exposição	Sushi	Biológico- microrganismos patogénicos Químico- toxinas	Controlo do tempo/temperatura; Boas práticas de higiene e de fabrico.

2.2. Variedades de *sushi*

O *sushi* pode ter diversas apresentações, das variedades mais comuns destacam-se: o *hoso maki*, o *niguri*, o *futo maki*, o *gunkan maki*, o *uramaki*, o *temaki*, o *sashimi* e o *chirashi sushi* (Feng, 2012; Barber & Takemura, 2014).

2.2.1. *Hoso maki*

O *hoso maki* é o tradicional *sushi* de rolo, supõe-se que tenha sido o primeiro *sushi* de rolo a ser confeccionado. É composto por arroz, *nori* e apenas mais um ingrediente, como por exemplo pepino ou atum (Barber & Takemura, 2014).



Figura 2 - Aspeto geral do *Hoso maki*. **Fonte:** original da autora.

2.2.2. *Nigiri*

O *nigiri* é moldado à mão para obter a sua forma oval, e servido com pasta de *wasabi* e uma fatia de peixe sobre o arroz. Os ingredientes tradicionais do *nigiri* são o abacate, o sargo e a solha-das-pedras, embora os mais comuns nos dias de hoje sejam o atum, a cavala, o salmão e o camarão (Barber & Takemura, 2014).



Figura 3 - Aspeto geral do *Nigiri*. **Fonte:** original da autora.

2.2.3. *Futo maki*

O *futo maki* também designado por *date maki* ou “rolo dandy” é de maiores dimensões que o *hoso maki*, por ser composto por diversos ingredientes. É enrolado com o arroz e os restantes ingredientes à alga *nori*, e servido com diversas combinações e apresentações. Os ingredientes mais utilizados são peixes, mariscos, frutos e vegetais. A mescla de ingredientes atenua a perceção de consumo de peixe *in natura*, graças às diversas cores, texturas e mistura de sabores apresentados num só rolo (Feng, 2012; Barber & Takemura, 2014).

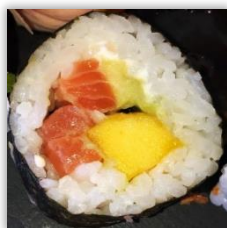


Figura 4 - Aspeto geral do *Futo maki*. **Fonte:** original da autora.

2.2.4. *Uramaki*

O *uramaki* também conhecido como “rolo califórnia” é enrolado de forma inversa, colocando a alga no interior do rolo e o arroz no exterior. Os ingredientes originais que o compõe são o abacate e a sapateira (Feng, 2012; Barber & Takemura, 2014).



Figura 5 - Aspeto geral do *Uramaki*. **Fonte:** original da autora.

2.2.5. *Gunkan maki*

O *gunkan maki* recebe esta designação pelo seu aspeto, que se assemelha a um barco, pela forma como a tira de *nori* é colocada para sustentar a sua cobertura de ovas, peixe ou ostras (Barber & Takemura, 2014).



Figura 6 -Aspeto geral do *Gunkan maki*. **Fonte:** Barber and Takemura, 2014.

2.2.6. *Temaki*

O *temaki* é enrolado à mão em forma de cone, o arroz é colocado sobre a folha de *nori* e enrolado com os restantes ingredientes. É normalmente composto por peixe ou frutos do mar, juntamente com frutos e vegetais, como manga, pepino e abacate (Feng, 2012; Barber & Takemura, 2014).

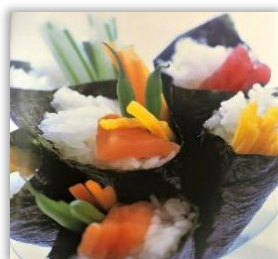


Figura 7 - Aspeto geral do *Temaki*. **Fonte:** Barber and Takemura, 2014.

2.2.7. *Sashimi*

O *sashimi* é uma iguaria japonesa que se resume a pedaços de peixe ou frutos do mar fatiados finamente, como atum, salmão ou lula. Podem ser servidos cozinhados, crus, marinados e com ou sem condimentos (Barber & Takemura, 2014; Liang *et al.*, 2016).



Figura 8 - Aspeto geral de *Sashimi*. **Fonte:** original da autora.

2.2.8. *Chirashi sushi*

O *chirashi sushi* é normalmente servido em tigelas individuais como prato único. O arroz é espalhado na tigela e decorado com os restantes ingredientes, que normalmente incluem diferentes variedades de peixe, frutos e vegetais (Barber & Takemura, 2014).

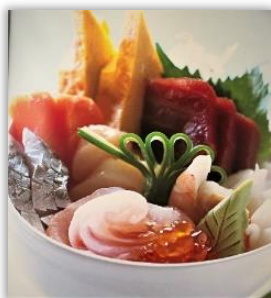


Figura 9 -Aspeto geral do *Chirashi sushi*. **Fonte:** Barber and Takemura, 2014.

A *wasabi* (pasta de rábano-bastardo ou mostarda japonesa) de sabor forte e picante, é consumida em pequenas quantidades juntamente com as peças, com o intuito de realçar o sabor dos ingredientes e o gengibre é servido à parte em forma de pickles cor-de-rosa, com o intuito de “limpar” o paladar entre os pratos, de forma a permitir uma melhor degustação (Barber & Takemura, 2014).

2.3. O *sushi* de fusão

Os fluxos de imigração originam o contacto entre culturas, e resultam numa influência de ambas as partes a que se dá o nome de hibridismo (Kato, Oliveira, Maciel & De Freitas, 2016). Este fenómeno, reflete-se também na gastronomia, resultando na “*cozinha de fusão*”, que sugere novos ingredientes e novas formas na preparação de pratos tradicionais,

adaptando-os aos hábitos e costumes dos habitantes locais, contudo mantendo as cores, os sabores, os temperos, a história e a cultura de onde têm origem (Kato *et al.*, 2016).

Uma das razões para a rápida disseminação do *sushi* em todo o mundo, foi a adaptação e a alteração dos ingredientes utilizados na elaboração deste prato e a forma como estes são apresentados. Os estabelecimentos incluem ingredientes familiares aos consumidores regionais, atraindo clientes mais recetivos ao consumo de peixe cru e de algas marinhas. Um exemplo de uma dessas adaptações, foi a criação do *uramaki* no início dos anos setenta, por um mestre japonês nascido na América, que teve como iniciativa a criação de um rolo de *sushi* enrolado de forma inversa, de maneira a que a alga não fosse tão perceptível ao consumidor, diminuindo assim as reações de aversão ao consumo de algas e peixe cru (Feng, 2012; Barber & Takemura, 2014).

2.4. *Sushi* e os seus benefícios nutricionais

2.4.1. Pescado

Dos vários ingredientes que compõem o *sushi*, fazem parte o peixe e produtos derivados da pesca. O consumo regular de pescado está associado a melhorias na saúde, o que fez aumentar a sua procura e inclusão, como base de uma alimentação saudável.

O pescado é considerado uma excelente fonte de proteína de alto valor biológico, tanto pela quantidade de proteína presente, com um teor total que na sua composição varia entre 15% e 25%, dependendo das espécies, como qualitativamente pois são fonte de aminoácidos essenciais como a lisina, a metionina e a cisteína. É de fácil digestibilidade e o seu teor em hidratos de carbono é baixo, geralmente são detetados valores inferiores a 0,5% (Sartori & Amancio, 2012). Contém vitaminas hidrossolúveis, como vitamina B6 e B12, e vitaminas lipossolúveis como vitamina A, D e E. Embora a concentração de vitaminas varie consoante as espécies, época do ano e localização geográfica, os peixes gordos, como o atum, a cavala, o arenque, a sardinha e o salmão, são ricos em vitamina A e D e geralmente fonte de minerais como cálcio, ferro, fósforo, cobre, selénio e iodo, no caso dos peixes de água salgada (Nunes, Bandarra & Batista, 2011; Girardet, 2012; Sartori & Amancio, 2012). O peixe é também rico em ácidos gordos polinsaturados ómega-3, principalmente peixes gordos como o salmão, o atum, a sardinha, a cavala, o robalo, o arenque, a anchova, a truta e o peixe-carvão-do-pacífico (Sidhu, 2003). Os ácidos gordos ómega-3 são reconhecidos pelos seus efeitos benéficos na prevenção de doenças cardiovasculares, redução dos níveis de triglicéridos, redução do risco de

doença coronária e de certas neoplasias, melhoria no desenvolvimento fetal, manutenção das funções cognitivas e prevenção de demência, sendo recomendado o consumo de peixes gordos pelo menos duas vezes por semana (Swanson, Block & Mousa, 2012; Domingo, 2016).

Outro benefício é o facto deste prato ser servido cru, o peixe e o marisco são normalmente servidos cozinhados, à exceção do *sushi*. Ainda que cozinhar os alimentos aumente a sua segurança, melhore o seu sabor, textura e digestibilidade, pode afetar a sua composição e o seu valor nutricional, favorecer a formação de compostos nocivos à saúde, resultar na perda parcial ou completa de vitaminas e minerais e contribuir para a alteração do perfil dos ácidos gordos (dependendo do modo de confeção) (Sobral, Cunha, Faria & Ferreira, 2018).

2.4.2. Arroz

O sabor característico do arroz torna-o de fácil combinação com outros ingredientes, fornece um ótimo aporte de energia, e juntamente com uma fonte de proteína compõem uma refeição equilibrada e rica em nutrientes. Fornece aminoácidos como os ácidos glutâmico e aspártico, e vitaminas como a tiamina (vitamina B1), que favorece o bom funcionamento do sistema nervoso, cardiovascular e a atividade celular na obtenção de energia, a riboflavina (vitamina B2), que auxilia o metabolismo na digestão dos lípidos, glícidos, proteínas, e na produção de energia celular, e a niacina (vitamina B3), que apresenta grande relevância no metabolismo celular, principalmente na reparação do material genético (Sousa, Amaral & Oliveira, 2012; Rohman, Helmiyati, Hapsari & Setyaningrum, 2014).

2.4.3. Algas marinhas

As algas marinhas são ricas em antioxidantes naturais, e a alga *nori* do género *Porphyra*, é a mais utilizada na preparação de *sushi*. Fornece aminoácidos, vitaminas do complexo A, B1, B2, B3, B12 e C, ácido fólico, ácidos gordos polinsaturados ómega-3 e ómega-6. Para além de terem baixo valor calórico, são bastante nutritivas e de fácil digestibilidade (Demetrio *et al.*, 2009; Pimenta, 2010).

2.4.4. Frutos e vegetais

O consumo de frutos e vegetais é recomendado pela Organização Mundial de Saúde para prevenção de diversas doenças crónicas e manutenção de uma alimentação saudável. São alimentos pouco calóricos, constituem uma boa fonte de fibra e aumentam o aporte de vitaminas

e minerais a este prato (World Health Organization [WHO], 2003).

2.4.5. Outros ingredientes

Em relação aos acompanhamentos que são servidos juntamente com este prato, a *wasabi* possui propriedades antibacterianas e antissépticas, estimula a produção de saliva (ajudando na digestão) e é rica em vitamina C. O gengibre fortalece o sistema imunitário, é um antisséptico natural, acelera o metabolismo e auxilia no combate a gripes e constipações. O molho de soja é feito à base de feijões de soja fermentados que são ricos em ferro, magnésio, potássio e proteínas (Barber & Takemura, 2014).

Embora os benefícios do *sushi* não sejam particularmente mencionados na literatura, os benefícios nutricionais dos principais ingredientes que o compõem são bastante referidos pelos profissionais de saúde pelos inúmeros benefícios que apresentam.

2.5. Sushi e os seus malefícios nutricionais

Uma das principais desvantagens nutricionais de uma refeição de *sushi* é o seu elevado teor de sódio, o peixe cru é salgado ou marinado para realçar o seu sabor e o molho de soja adiciona ainda mais sódio a esta refeição dado que uma colher de chá deste molho apresenta um teor sódio de 6%. Indivíduos que sofram de hipertensão devem ter especial atenção com o seu consumo (Yamamoto & Hicks, 2005; Sousa *et al.*, 2012).

O açúcar refinado adicionado ao arroz durante a sua preparação, pode ser um problema, além de aumentar o seu índice glicémico, o açúcar refinado é um componente prejudicial à saúde, possui propriedades inflamatórias, induz a resistência à insulina e diabetes (Garcia *et al.*, 2019). Devido ao elevado teor de açúcar que é adicionado ao arroz, pessoas com diabetes *Mellitus* devem moderar o seu consumo (Sousa *et al.*, 2012).

O “*sushi de fusão*” servido atualmente acrescenta um aporte calórico significativo a este prato, em relação ao tradicional, uma vez que são adicionados ingredientes como molho *teryaki*, molho agri-doce, maionese, queijo creme entre outros ingredientes ricos em gordura e açúcar (Yamamoto & Hicks, 2005; Nascimento, Nóbrega, Ventura & Callou, 2019).

3. Doenças de origem alimentar

O aumento da ingestão de pescado cru, associado ao aumento do consumo de *sushi* é uma preocupação de saúde pública. O consumo de *sushi* é considerado de alto risco, pelos perigos que pode albergar colocando em causa a saúde dos consumidores, uma vez que sem

tratamento térmico adequado, pode transmitir doenças com origem bacteriana, parasitária e viral (Pinheiro *et al.*, 2006; Feng, 2012).

As doenças de origem alimentar são caracterizadas por um conjunto de sintomas sendo os gastrointestinais os mais frequentes e normalmente englobam vômitos, diarreia, febre e dores abdominais, que ocorrem em simultâneo ou individualmente (Pinto, 1996; WHO, 2017). Um surto é definido pelo aparecimento da mesma sintomatologia, geralmente gastrointestinal, em dois ou mais indivíduos, devido ao consumo do mesmo alimento (Novais, 1998; WHO, 2008). Entre as causas mais comuns de surtos encontram-se os microrganismos patogénicos e as suas toxinas (Rodrigues, Guiné & Correia, 2015). Existem poucos dados relativamente a doenças de origem alimentar em Portugal, nem sempre os casos que ocorrem são declarados, a maioria das vítimas de intoxicação ou infeção alimentar, não recorrem a tratamento médico, e por outro lado, quando o fazem nem sempre são realizadas as devidas análises para identificação do agente. Além disso, apenas algumas doenças de origem alimentar são de declaração obrigatória, sendo o número de casos declarados, inferior aos que ocorrem na realidade, não existindo um conhecimento do número real da sua incidência nem dos agentes envolvidos (Veiga *et al.*, 2009).

A ocorrência de uma doença de origem alimentar é dependente de vários fatores individuais e da dose infetante ingerida, a qual se traduz pelo número de microrganismos necessários para causar doença. São considerados como grupos de risco para doenças alimentares: crianças, gestantes, idosos e imunodeprimidos, que podem ser mais sensíveis quando expostos a um menor número de microrganismos, do que um indivíduo adulto saudável (Council for Agricultural Science and Technology [CAST], 1994; Ray, 2005).

A maioria dos surtos surgem devido à ingestão de alimentos contaminados sem alterações organoléticas perceptíveis aos consumidores, isto porque a dose infetante de patogénicos alimentares presentes, geralmente é menor do que a quantidade de microrganismos necessários para degradar o alimento, o que dificulta a rastreabilidade dos alimentos que podem eventualmente causar doença. Alimentos com aparência, cor e odor alterados dificilmente causam surtos alimentares, uma vez que são notados e rejeitados pelos consumidores antes de serem consumidos. Nestas situações normalmente a contaminação microbiológica é elevada, com valores superiores a 10^8 ufc/g (unidades formadoras de colónias por grama de alimento) (Oliveira, Paula, Capalonga, Cardoso & Tondo, 2010).

As doenças transmitidas pelos alimentos são classificadas em dois grandes grupos: intoxicações alimentares e infeções alimentares (Novais, 1998).

As intoxicações alimentares, ocorrem quando são ingeridas toxinas microbianas ou fúngicas, micotoxinas, presentes no alimento, mesmo quando os microrganismos que lhes deram origem se encontram inviáveis. As toxinas geralmente não causam alterações organolépticas nos alimentos, o que aumenta o risco de intoxicação. São exemplo as micotoxinas, como a aflatoxina B₁, a toxina de *Clostridium botulinum* e a enterotoxina de *Staphylococcus* (CAST, 1994; Ray, 2005).

As infecções alimentares, ocorrem quando a dose infetante de microrganismos patogênicos presentes no alimento é capaz de se multiplicar e colonizar o intestino, invadir os tecidos e causar doença. Como exemplo desses microrganismos temos *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e o vírus da hepatite A. Quando as infecções são mediadas por toxinas ocorrem quando a quantidade de microrganismos patogênicos presentes, são capazes de produzir ou libertar toxinas após a ingestão do alimento. *Vibrio cholerae* e *Clostridium perfringens* são exemplo de microrganismos que podem dar origem a estas infecções (CAST, 1994; Ray, 2005).

4. Principais perigos veiculados através do consumo de *sushi*

Segundo a definição da *Codex Alimentarius Commission*, o conceito de perigo alimentar é qualquer agente químico, físico ou biológico, presente num género alimentício, que possa causar um efeito adverso à saúde do consumidor. Dependendo da sua natureza podem ser classificados em perigos químicos, físicos ou biológicos (CAC, 2003).

4.1. Perigos físicos

Os perigos físicos são descritos como qualquer objeto que surja num género alimentício, que não faça parte deste, e que possa causar danos à saúde do consumidor. Embora não ocorram com muita frequência, quando ocorrem, podem causar graves lesões à saúde do consumidor. A severidade das lesões depende das características do indivíduo, sobretudo da sua faixa etária, e das características físicas do perigo, como a forma, a dimensão e o material, que definem a capacidade de corte, perfuração, asfixia e morte pelo perigo.

Estes perigos podem estar associados às matérias-primas, ou serem introduzidos acidentalmente em qualquer ponto da cadeia, através dos equipamentos, utensílios ou manipuladores. São considerados perigos físicos materiais como vidros, madeiras, metais, pedras, ossos, plásticos, cabelos, objetos pessoais, entre outros (Baptista & Venâncio, 2003; Amaral & Oliveira, 2013).

Nos produtos de pesca podem ocasionalmente surgir materiais derivados da sua

atividade como fios e anzóis, fragmentos de madeira, vidro, plástico, conchas, pedras, espinhas, entre outros materiais, que podem causar injúria quando ingeridos, nomeadamente asfixia, trauma dentário e lacerações no aparelho digestivo (Pinho, 2015). Além do pescado, os diversos ingredientes utilizados na confeção de *sushi*, como o arroz e as hortofrutícolas podem igualmente conter perigos físicos (Veiga *et al.*, 2009; Prado *et al.*, 2014). Como prevenção devem ser cumpridas boas práticas de higiene e de fabrico pelos manipuladores, higienização das estruturas e equipamentos e inspeção periódica dos mesmos, controlo de pragas, planos de higienização e procedimentos HACCP a fim de minimizar o risco de ocorrência (Veiga *et al.*, 2009).

4.2. Perigos químicos

Os perigos químicos podem ter diversas origens, ser intrínsecos às matérias-primas ou resultar de contaminação durante alguma fase do processamento. De entre todos os perigos químicos existentes têm especial relevância: as micotoxinas, as toxinas naturais, os pesticidas químicos, os metais pesados, os alergénios, os medicamentos de uso veterinário (antibióticos, promotores de crescimento), os aditivos alimentares (em concentrações impróprias), os nitritos e nitratos, as nitrosaminas e produtos químicos utilizados na limpeza, desinfeção e lubrificação (Baptista & Venâncio, 2003; Afonso, 2008).

Embora muitos dos perigos químicos não causem efeitos imediatos, é importante salientar que a exposição prolongada dos consumidores a pequenas doses de contaminantes, ao longo do tempo pode ser um risco para a saúde e predispor ao aparecimento de várias doenças de carácter agudo ou crónico (Veiga *et al.*, 2009).

4.2.1. Biotoxinas marinhas

As biotoxinas marinhas, exceto a tetrodotoxina, são sintetizadas por microalgas, a maioria das quais são dinoflagelados, que contaminam moluscos bivalves e causam intoxicações (Huss, 1997). A tetrodotoxina ou tetrodontoxina, também conhecida por “veneno fugu” encontra-se nos peixes da família *Tetradontidae* (peixe balão), que acumulam esta toxina principalmente na pele, ovários, fígado e com menor frequência no músculo. É responsável por vários envenenamentos letais, e os sinais de intoxicação durante o seu consumo são a tumefação dos lábios e boca (Veiga *et al.*, 2009; Cruz, Mateus, & Rocha, 2015).

O termo Ciguatera engloba as ciguatoxinas, que são toxinas termicamente estáveis, e cujo mecanismo de ação ainda não se encontra totalmente conhecido, e as maitotoxinas.

Acumulam-se em maior quantidade em peixes como a moreia, a barracuda, a sardinha do Pacífico, a garoupa de São Tomé e a tainha. Os sintomas de intoxicação são maioritariamente sintomas gastrointestinais e neurológicos, que podem permanecer durante horas a semanas, e em casos mais graves podem resultar em morte (Veiga *et al.*, 2009; Cruz *et al.*, 2015).

Na Europa são conhecidas há várias décadas, a intoxicação paralisante por marisco (*Paralytic Shellfish Poisoning* [PSP]) e a intoxicação diarreica por marisco, (*Diarrhetic Shellfish Poisoning* [DSP]) sendo estas as principais biotoxinas que contaminam os bivalves da costa continental Portuguesa (Vale, 2011).

De entre todas as intoxicações de origem marinha, a intoxicação pela PSP é a que ocorre com maior frequência, e a que apresenta repercussões mais graves, cerca de 6% da taxa de mortalidade mundial é devida a intoxicação por esta toxina (Cruz *et al.*, 2015). Os bivalves com maior concentração desta toxina são as conchas e os mexilhões (Veiga *et al.*, 2009) também se encontra descrita em ostras, amêijoas, vieiras, lingueirão e berbigão. Os sintomas desenvolvem-se entre 30 minutos e 2 horas após a ingestão, e incluem: sensação de dormência na boca e ponta dos dedos, formigueiro, sonolência, dores de cabeça, náuseas e vômitos. Em casos mais graves, pode ocorrer discurso incoerente, ataxia, paralisia dos membros e morte devido a paragem respiratória (Huss, 1997; Cruz *et al.*, 2015).

A toxina DSP encontra-se em concentrações mais elevadas em conchas, mexilhões e berbigões, acumulam-se no tecido adiposo do pescado e quando ingerida causa vômitos, diarreia, náuseas e dores abdominais. Os sintomas ocorrem poucas horas após a ingestão e geralmente as vítimas recuperam entre 3 a 4 dias (Huss, 1997; Veiga *et al.*, 2009; Cruz *et al.*, 2015).

A toxina *Neurotoxic Shellfish Poisoning* (NSP) contamina os bivalves quando se encontram em contacto com o dinoflagelado *Ptychodiscus brevis*, estas algas são também conhecidas como “marés vermelhas”. Os sintomas incluem suores frios, vômitos e descoordenação motora, ocorrendo 3 horas após a ingestão (Huss, 1997; Cruz *et al.*, 2015).

A intoxicação pela *Amnesic Shellfish Poisoning* (ASP) é devida ao ácido domóico, produzido pela diatomácea *Nitzschia pungens*. A sintomatologia associada inclui: náuseas, diarreia, vômitos, perda de equilíbrio, amnésia temporária ou permanente, coma e morte, que podem ser manifestados até 3 dias após a ingestão (Huss, 1997; Cruz *et al.*, 2015).

4.2.2. Histamina

A intoxicação química por histamina resulta da ingestão de géneros alimentícios com elevados teores deste composto, que se forma através da descarboxilação bacteriana do aminoácido histidina durante o período *post-mortem* do pescado. Embora peixes da família *Scombridae* como o atum, a cavala e o robalo, contenham níveis mais elevados de histidina livre, também peixes não-escombroídes como o arenque e a sardinha, podem igualmente estar associados a esta intoxicação (Huss, 1994). Os casos de intoxicação por atum podem também estar associados a outras aminas biogénicas (Masson & Pinto, 1998).

As bactérias relacionadas com a produção deste composto são encontradas na maioria dos peixes após a captura, encontram-se naturalmente presentes nas brânquias, no intestino e na pele, enquanto outras fontes de contaminação são superfícies de contacto e manipuladores (Mercogliano & Santonicola, 2019). Destacam-se como bactérias produtoras de histamina, algumas *Enterobacteriaceae*, certos *Vibrio* spp., *Clostridium* e *Lactobacillus* spp. e como maiores produtoras, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Hafnia alvei* (Huss, 1994; Mercogliano & Santonicola, 2019).

A produção de histamina é mais rápida a temperaturas $\geq 21,1$ °C do que a temperaturas moderadas de 7,2 °C, sendo particularmente acentuada a 32,2 °C. A produção deste composto pode ocorrer desde o momento da captura até ao consumo, a enzima envolvida no processo de formação de histamina (histidina descarboxilase), uma vez presente no peixe pode manter-se ativa a temperaturas de refrigeração e permanecer estável durante o processo de congelação, até mesmo quando as bactérias se tornam inviáveis. As bactérias e as enzimas podem ser inativadas por tratamento térmico como a cozedura, no entanto caso a histamina já se encontre formada não é eliminada, por estas razões, a formação de histamina ocorre com maior frequência em peixe cru e descongelado. A evisceração e remoção das brânquias podem reduzir o número de bactérias produtoras de histamina, mas não eliminá-las totalmente (Food and Drug Administration [FDA], 2019; Mercogliano & Santonicola, 2019).

O perigo da histamina no pescado é intensificado pela capacidade de conferir toxicidade ao produto, mesmo antes da sua deterioração e alteração sensorial ser notada pelos consumidores. O aparecimento de sintomas geralmente ocorre 1 hora após a ingestão e inclui: sintomas gastrointestinais (náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarreia), sintomas neurológicos (sensação de formiguelo, dores de cabeça, palpitações, prurido e ardor), sintomas cutâneos (urticária e erupção cutânea) e hipotensão. A histamina possui potencial alergénico,

podendo causar um quadro de intoxicação mais grave em indivíduos alérgicos à histamina (Ray, 2005; Souza, Calixto, Mesquita, Packness, & Azeredo, 2015).

O controlo deste perigo baseia-se essencialmente na monitorização do tempo e temperatura a que o produto é exposto durante todo o processo, que se forem inadequados permitem a formação de histamina (Masson & Pinto, 1998). O arrefecimento rápido e imediato *post-mortem* do pescado é um dos passos mais importantes para impedir a formação de histamina, além disso, vários fatores como as condições pós-captura, o processamento, o armazenamento e a distribuição podem influenciar a sua produção (FDA, 2019; Mercogliano & Santonicola, 2019).

Na União Europeia, o Regulamento (CE) nº 2073/2005 de 15 de novembro 2005, estabeleceu limites para os produtos da pesca, de espécies de peixes passíveis de ter um elevado teor de histidina, principalmente espécies das famílias: *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae* e *Scombresosidae*, o intervalo de histamina estabelecido, é compreendido entre 100 mg/kg e 200 mg/kg. No caso de produtos de pesca submetidos a tratamento de maturação enzimática em salmoura e fabricados a partir de espécies de peixe associadas a um elevado teor de histidina, os limites estabelecidos pelo regulamento são entre 200 mg/kg e 400 mg/kg.

Em ambos os casos, o plano de amostragem é de 9 amostras, em que apenas 2/9 amostras podem apresentar valores dentro deste intervalo estabelecido (Regulamento (CE) nº 2073/2005).

4.2.3. Metais pesados

A contaminação de géneros alimentícios com metais pesados é uma preocupação, os alimentos com maior número de alertas para estes perigos são peixes, crustáceos e moluscos. Os metais pesados presentes no pescado, que apresentam maiores riscos para os seres humanos, são o cádmio, o chumbo e o mercúrio (Hg), sendo este último o de maior relevância (Veiga *et al.*, 2009).

O Hg encontra-se no meio ambiente devido a atividades antropogénicas, como despejo de resíduos industriais e domésticos, processos naturais, como atividade vulcânica e decomposição de rochas que contêm Hg na sua composição. Quando presente no ambiente, o Hg é transformado por bactérias em metilmercúrio (MeHg), a forma química mais tóxica do Hg, que rapidamente entra na cadeia alimentar marinha não só pela absorção de MeHg que se encontra na água, como através da alimentação de outros peixes contaminados. Geralmente os

peixes com níveis mais elevados de metais pesados, são os que se encontram no topo da cadeia alimentar, de maiores dimensões, que vivem mais tempo, que ingerem uma maior quantidade de alimento, e que conseqüentemente sofrem uma maior biomagnificação, como exemplo temos o espadarte e o atum. Embora o MeHg geralmente se acumule através da cadeia alimentar nos peixes selvagens, o consumo de peixes de aquacultura pode igualmente apresentar riscos, devido à presença de MeHg em rações destinadas ao consumo desses animais. A bioacumulação de mercúrio pelos consumidores, depende da quantidade de mercúrio presente no peixe, da frequência do seu consumo e da quantidade que é ingerida. Também o arroz cultivado em áreas contaminadas com Hg pode apresentar níveis prejudiciais de MeHg (Morgano, Gomes, Mantovani, Perrone, & Santos, 2005; Costa & Fattori, 2010).

O MeHg quando entra no organismo acumula-se nos rins, fígado e no sistema nervoso central. Em gestantes provoca efeitos tóxicos irreversíveis no feto, embora a progenitora não tenha sintomatologia associada, pode causar atrasos no desenvolvimento fetal, malformações (maioritariamente do canal auditivo), paralisia cerebral, convulsões, distúrbios mentais e cegueira. Os sintomas de intoxicação por Hg podem ser agudos ou crônicos. A intoxicação aguda ocorre pela ingestão de alimentos contaminados com MeHg, os sintomas podem ser leves a letais nomeadamente: vômitos, tremores, ataxia, discurso incoerente, paralisia, afonia, cegueira, coma e morte. No caso de intoxicação crônica, afeta principalmente o sistema nervoso central, com manifestações de ataxia, parestesia, dificuldades na fala, fraqueza, fadiga, incapacidade de concentração, perda de visão e audição, coma e morte (Costa & Fattori, 2010).

4.2.4. Micotoxinas

As micotoxinas são substâncias tóxicas de difícil controlo, são produzidas por algumas espécies de fungos filamentosos que podem contaminar alimentos destinados ao consumo humano e animal (Iamanaka, Oliveira, & Taniwaki, 2010). Ocorrem naturalmente no meio ambiente, e desenvolvem-se, em condições ambientais favoráveis, em: cereais, frutos secos, frutas e legumes. Os fungos mais comuns nos alimentos são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, e as micotoxinas com maior relevância no setor agroalimentar são as aflatoxinas, as ocratoxinas, as fumonisinas e a patulina (Iamanaka *et al.*, 2010; Viegas, 2010).

As micotoxinas podem estar presentes em ingredientes de rações destinadas ao consumo de peixes de aquacultura, nomeadamente no milho e no farelo de algodão, que são frequentemente utilizados em rações, e são muito propensos à contaminação por aflatoxinas (Manning, 2010). Os frutos, principalmente a maçã, podem ser contaminados com a micotoxina

patulina, produzida por várias espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssoschlamys* que causam deterioração (Puel, Galtier & Oswald, 2010).

As propriedades químicas do arroz e o seu modo de cultivo, fazem com que seja suscetível à contaminação fúngica e à presença de micotoxinas, tornando-se impróprio para consumo (Guimarães, Souza, Cornélio, Pereira & Villela, 2010). Num estudo onde foram analisadas 90 amostras de arroz, foi detetada a presença de aflatoxinas em 68 (75,6%) amostras das quais, 13 (13,5%) encontravam-se acima do limite estabelecido pela União Europeia, sendo a aflatoxina B₁ a mais comumente encontrada (Miranda, Moreano & Ocampo, 2018).

As manifestações clínicas podem ser bastante variáveis, enquanto as aflatoxinas podem causar lesões hepáticas e estão relacionadas com efeitos carcinogénicos, a patulina, os tricotecenos e as fumonisinas podem interferir com o sistema imunitário, e a ocratoxina A, pode provocar danos renais (Veiga *et al.*, 2009).

4.2.5. Medicamentos de uso veterinário

Os medicamentos veterinários são muitas vezes utilizados como profilaxia e tratamento de diversas doenças, com o objetivo de aumentar a produção e os ganhos económicos. Quando não são respeitadas todas as recomendações, e os respetivos intervalos de segurança, é possível a presença de resíduos farmacológicos em géneros alimentícios. Além disso, os fármacos administrados são libertados no meio ambiente através dos excrementos animais, podendo contaminar vários recursos hídricos (Hoff, 2017). O uso indiscriminado de antibióticos em aquacultura pode favorecer o aparecimento de estirpes bacterianas resistentes, tanto em bactérias comensais presentes no trato intestinal do homem e animais, como bactérias presentes no meio ambiente. Têm sido reportados vários casos de resistências a antibióticos em aquacultura, principalmente do género *Aeromonas* e da família *Enterobacteriaceae* que são os mais estudados, tendo em conta o seu potencial patogénico. Também já foi reportada a transferência de genes de resistência entre *Aeromonas salmonicida* a bactérias como *Echerichia coli* (Gastalho, Silva & Ramos, 2014). Os peixes podem servir de reservatório a vários genes de resistência a antibióticos, e com o consumo de peixe cru podem facilmente ser transferidos aos seres humanos (Silva *et al.*, 2019).

A presença de resíduos farmacológicos em géneros alimentícios, além de propiciar o desenvolvimento de resistências a antibióticos, diminuindo a sua eficácia no tratamento de várias infeções, podem também despoletar reações alérgicas graves nos consumidores, e predispor ao desenvolvimento de doenças cancerígenas (Baptista & Venâncio, 2003).

4.2.6. Poluentes orgânicos persistentes

Os poluentes orgânicos persistentes (POP) são compostos voláteis, lipofílicos e ubiqüitários, resultantes de atividades urbanas, industriais e agrícolas. O consumidor entra em contacto com estes compostos, que têm efeito cumulativo no organismo, principalmente através da alimentação. Dos POP destacam-se, os pesticidas organoclorados (OCP), compostos pertencentes ao grupo das dioxinas, bifenilos policlorados (PCB), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) e difeniléteres polibromados (PBDE) (Smith & Gongolli, 2002; Dórea, 2008). Os agrotóxicos apesar de apresentarem benefícios de sustentabilidade na agricultura, se forem utilizados de forma inadequada, acumulam-se na água, solo e meio ambiente, podendo permanecer em frutos e vegetais em valores superiores aos permitidos (Passos & Reis, 2013). No ambiente marinho a presença de resíduos de pesticidas e substâncias tóxicas, podem acumular-se no músculo de peixes, principalmente em peixes gordos como a cavala, e em moluscos (Masson & Pinto, 1998; Smith & Gongolli, 2002).

Os efeitos adversos destas substâncias estão relacionados com efeitos tóxicos no organismo, disfunções no sistema reprodutor, endócrino, nervoso e imunitário, alterações no desenvolvimento (principalmente no desenvolvimento fetal), danos hepáticos, doenças dermatológicas, oculares e morte (Corsolini, Ademollo, Romeo, Greco & Focardi, 2005).

4.3. Perigos biológicos

Os perigos biológicos são os que representam maior risco de um género alimentício se tornar inseguro, e provocar danos na saúde do consumidor, estimando-se que os microrganismos sejam responsáveis por cerca de 90% deste tipo de doenças (Veiga *et al.*, 2009).

Fazem parte deste grupo: bactérias, parasitas, fungos, vírus e toxinas microbianas. Estão normalmente associados aos manipuladores de alimentos, ao meio ambiente (ar, água e equipamentos) e às matérias-primas (Afonso, 2008; Satin, 2008).

É de referir que todos os alimentos são de origem animal ou vegetal, e por consequência, expostos ao meio ambiente sendo expectável que contenham microrganismos incluindo patogénicos. As águas de rios e mares estão contaminadas devido a despejos de esgotos domésticos e industriais e podem contaminar o ingrediente principal do *sushi*, o pescado. Outra fonte de contaminação é o maneo do pescado desde a captura até ao consumo final. De igual modo a contaminação dos produtos vegetais usados no *sushi* pode ser proveniente do solo, da água de rega, insetos e manipulação na colheita e distribuição. Acresce

que o *sushi* não é sujeito a nenhum tratamento térmico que permita a eliminação de patogénicos durante a sua preparação, o que não permite eliminar o risco associado ao seu consumo. A prevenção da maior parte destes perigos é essencialmente a adoção de boas práticas de higiene e fabrico durante toda a cadeia de produção (Huss, Reilly & Embarek, 2000; Baptista & Venâncio, 2003; Basti, Misaghi, Salehi & Kamkar, 2006; Satin, 2008; Santos *et al.*, 2012).

4.3.1. Vírus

Os vírus são microrganismos que necessitam de células vivas para se reproduzirem, embora mesmo sem a sua presença consigam sobreviver. Não se replicam na água ou no pescado, e a sua presença no pescado deve-se à contaminação por parte dos manipuladores de alimentos ou água contaminados, sendo a contaminação fecal direta ou indireta a mais comum nos géneros alimentícios (Huss, 1997).

As viroses entéricas parecem ser as principais doenças associadas ao consumo de mariscos, talvez pelo facto de os bivalves filtradores concentrarem os vírus presentes na água onde se desenvolvem. Salvo algumas exceções, todos os casos reportados de infeções virais associadas ao pescado estão relacionados com o consumo de moluscos crus ou insuficientemente cozinhados. A dose infetante de vírus relacionada com a ingestão de alimentos, é possivelmente muito inferior à das bactérias (Huss, 1997). Os principais vírus que podem ser veiculados pelo *sushi* são: o Vírus da hepatite tipo A (VHA), Calicivírus, Astrovírus, Vírus não-A e não-B e Vírus de Norwalk (Sousa *et al.*, 2012). Na tabela 2 estão descritos os principais vírus que podem ser veiculados através do pescado e a sintomatologia associada.

Tabela 2- Principais vírus presentes no pescado e sintomatologia associada (Adaptado de Huss, 1997).

Vírus	Sintomatologia
Hepatite tipo A (VHA)	Náuseas, febre, perda de apetite, fadiga, diarreia e icterícia.
Norovírus GI e GII (Vírus Norwalk)	Náuseas, vómitos, diarreia, dores abdominais, dores de cabeça e febre baixa.
Calicivírus	Náuseas, vómitos, dor abdominal, diarreia e cefaleia.
Astrovírus	Dor de cabeça, febre e náusea.
Não-A e Não-B	Náuseas, febre, perda de apetite, fadiga, diarreia.

4.3.2. Parasitas

Os peixes e os frutos do mar, são hospedeiros naturais de vários parasitas, sendo fonte de infecção para o ser humano. Entre os principais produtos crus relacionados com este tipo de infecções encontram-se o *sushi* e o *sashimi* (Masson & Pinto, 1998).

Os parasitas representam um perigo biológico quando são consumidos no seu estado larval, em peixes e moluscos crus, insuficientemente cozinhados, ou sem processo prévio de congelamento adequado (Masson & Pinto, 1998). São inúmeras as infecções parasitárias que representam sérios riscos à saúde humana e que podem ser transmitidas através do pescado (Melo, Holanda, Martins & Rodrigues, 2014). Dos parasitas mais comuns, que podem ser veiculados através do consumo de pescado cru destacam-se os helmintas, principalmente nemátodos, que causam infecções intestinais e extra-intestinais, os tremátodos que causam infecções hepáticas, pulmonares e intestinais (Masson & Pinto, 1998) e os céstodos que causam infecções gastrointestinais (Chai, Murrel & Lymberry, 2005). Na tabela 3 estão descritas algumas das infecções parasitárias que podem ser veiculadas através do consumo de pescado cru.

Tabela 3- Infecções parasitárias adquiridas pelo consumo de pescado cru (Masson & Pinto, 1998).

Parasita	Período de incubação
Tremátodos	
<i>Paragonimus westermani</i>	3 meses
<i>Clonorchis sinensis</i>	4 semanas
<i>Opisthorchis viverrini</i>	4 semanas
<i>Opisthorchis felineus</i>	4 semanas
<i>Metorchis conjunctus</i>	1-2 semanas
<i>Nanophyetus salmincola</i>	1 semana
<i>Heterophyes heterophyes</i>	7-10 dias
<i>Metagonimus yokogawai</i>	7-10 dias
<i>Echinostoma</i>	10-30 dias
Céstodos	
<i>Diphyllobothrium latum</i>	3-5 semanas
Nemátodos	
<i>Capillaria philippinensis</i>	2 semanas
<i>Anisakis, Phocanema ou</i>	
<i>Contracaecum</i>	0-10 dias
<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	0-30 dias
<i>Gnathostoma spinigerum</i>	3-4 semanas

Em países onde o consumo de peixe cru é uma prática frequente é comum a infecção por céstodos do género *Diphyllbothrium* (Chai *et al.*, 2005). O salmão é um dos hospedeiros intermediários de *Diphyllbothrium latum* causando difilobotriose, quando a larva infetante é ingerida, esta adere à mucosa do intestino delgado, podendo atingir cerca de 5 a 10 metros de comprimento em adulto. Durante a infecção pode ocorrer anemia, derivada a níveis reduzidos de vitamina B₁₂ causada pela presença do parasita. Estas infecções são normalmente observadas em zonas de clima frio como no Norte da Europa e na América do Norte (Nawa, Hatz & Blum, 2005).

A anisaquidose é causada pela ingestão de larvas da família *Anisakidae* presente em peixes e frutos do mar crus ou insuficientemente cozinhados. É comum em peixes como o salmão, o bacalhau, o arenque e a cavala (Hokama *et al.*, 2019). A anisaquidose pode assumir várias formas, dependendo da localização e das lesões causadas pelo parasita. Estes podem permanecer no trato gastrointestinal sem penetrar nos tecidos, sendo a infecção assintomática, ou penetrarem na mucosa gástrica e intestinal. Os sintomas de anisaquidose gástrica manifestam-se entre 1 a 7 horas após o consumo, enquanto a intestinal, geralmente manifesta-se entre 5 a 7 dias após o consumo (Chai *et al.*, 2005). Os sintomas incluem dor abdominal, náusea, diarreia e vômito. O exame histopatológico pode revelar a presença de granulomas eosinofílicos causados pelo parasita. Uma reinfeção pode originar reações alérgicas sistémicas, como urticária e anafilaxia (Chai *et al.*, 2005; Hokama *et al.*, 2019).

Segundo a FDA (2011), citado por Sousa *et al.*, (2012), a eliminação eficaz de parasitas, depende da temperatura de congelação, do tempo que o produto permanece a essa temperatura, e da espécie de parasita presente. São considerados métodos de congelação eficazes na eliminação de parasitas: congelação durante 7 dias a -20 °C (ou abaixo); congelação durante um mínimo de 15 horas a -35 °C; congelação a -35 °C até o produto estar totalmente congelado e de seguida armazenado a -20 °C durante 24 horas.

4.3.3. Bactérias

As bactérias multiplicam-se muito rapidamente em condições favoráveis, algumas possuem mecanismos para resistir a condições adversas, como altas temperaturas com a formação de esporos e baixas temperaturas, sobrevivendo até ao processo de congelação (Feng, 2012). Certas bactérias que contaminam os alimentos são patogénicas e causam doença, enquanto outras indicam condições de higiene precárias, e são sugestivas da presença de microrganismos patogénicos (Vallandro, Campos, Paim, Cardoso & Kindlein 2011).

O peixe é o ingrediente principal de um prato de *sushi*, é considerado altamente perecível e muito propício à contaminação e proliferação bacteriana, pelas suas propriedades intrínsecas, como: ser rico em nutrientes, possuir um teor de gorduras facilmente oxidáveis, ter um pH próximo da neutralidade ($6,6 \pm 6,8$) e uma elevada atividade da água (a_w) (Jay, Loessner & Golden, 2005).

Existem vários fatores extrínsecos que podem favorecer o crescimento de microrganismos patogénicos e de deterioração, comprometendo a segurança do produto. O local de captura influencia a contaminação do pescado, certos microrganismos encontram-se naturalmente presentes no ambiente marinho, como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium botulinum* tipo E, *Vibrio* spp., *Listeria* spp. e *Aeromonas* spp. (Huss *et al.*, 2000; Sousa *et al.*, 2012). O manuseio pós-captura onde a contaminação pode ocorrer se a higiene das embarcações e dos operadores for deficiente, a lavagem do pescado com água contaminada, o contacto com gelo contaminado, e o armazenamento do pescado a temperaturas inadequadas, são outras fontes de contaminação do pescado por bactérias (Germano, Oliveira & Germano 1993; Miguéis, Santos, Saraiva & Esteves 2014).

Como referido anteriormente, os demais ingredientes utilizados na preparação de *sushi*, como os frutos, os vegetais e o arroz, podem igualmente ser fonte de microrganismos como: *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*. É imprescindível que os manipuladores mantenham boas práticas de higiene pessoal e de fabrico, de modo a garantir um produto de qualidade e a segurança microbiológica no fim do seu processo (Garrido *et al.*, 2004; Muscolino *et al.*, 2014).

4.3.3.1. *Salmonella* spp.

Os microrganismos do género *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae*, são anaeróbios facultativos, bacilos Gram-negativos, não esporulados, oxidase negativa e catalase positiva. Fermentam a glucose e outros hidratos de carbono com produção de ácido e gás, utilizam o citrato como fonte de carbono, produzem ácido sulfídrico, descarboxilam a lisina e a ornitina e não hidrolisam a ureia (D'Aoust & Maurer, 2007; Leyral & Vierling, 2007). São capazes de se adaptar e crescer em condições ambientais extremas, com valores mínimos de a_w 0,93 e valores de pH entre 4,5 e 9,5, sendo o pH ótimo entre 6,5 e 7,5. Têm temperatura ótima de crescimento a 37 °C, embora algumas estirpes cresçam a temperaturas de 54 °C, e outras em produtos armazenados de 2 °C a 4 °C constituindo um problema de segurança alimentar (D'Aoust & Maurer, 2007). A maioria das estirpes não se multiplica a temperaturas

de refrigeração, e podem resistir ao processo de congelação, mas são destruídas por tratamentos como a pasteurização ou a irradiação. A salmonelose ocorre por ingestão de água e alimentos contaminados e, atualmente, encontram-se descritos cerca de 2.500 serotipos de *Salmonella*, (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica [ASAE], 2007a; FDA, 2009; Health Protection Agency [HPA], 2009). Dependendo dos serovares envolvidos na infecção, os sintomas diferem, podendo dar origem a diferentes síndromes: *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi A B C, causam a síndrome da febre entérica ou tifoide, têm um período de incubação de 3 a 56 dias, os sintomas associados são: febres altas e persistentes, dores de cabeça, musculares e abdominais, fraqueza muscular e suores. A sintomatologia pode persistir durante 1 a 8 semanas (ASAE, 2007a; Leyral & Vierling, 2007).

A síndrome de enterocolite, pode ser originada pela maioria dos serotipos de *Salmonella* (Leyral & Vierling, 2007). O período de incubação varia entre 8 e 72 horas após a ingestão, e o período de convalescença é de 2 a 5 dias. Os sintomas mais comuns são: náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia e febre (ASAE, 2007a; D'Aoust & Maurer, 2007).

Algumas estirpes de *Salmonella* podem dar origem a septicémias e problemas crónicos como artrite reativa e síndrome de Reiter (ASAE, 2007a).

4.3.3.2. Patotipos de *Escherichia coli*

As bactérias do género *E. coli* pertencem à família *Enterobacteriaceae*, são microrganismos anaeróbios facultativos, bacilos Gram-negativos, não esporulados, catalase positiva, oxidase negativa, fermentadores da glucose e da lactose. *E. coli* faz parte da microbiota intestinal do homem e de outros animais de sangue quente, no entanto, as estirpes patogénicas não são consideradas comensais, a maior parte dos surtos ocorrem devido à ingestão de água e alimentos contaminados com material de origem fecal, por mau saneamento e más práticas de higiene. São microrganismos capazes de crescer entre os 7 °C e os 50 °C, sendo a temperatura ótima de crescimento de 37 °C. Geralmente as estirpes patogénicas conseguem sobreviver a temperaturas de refrigeração e congelação por um longo período. A a_w mínima que permite o seu crescimento é 0,95, os valores de pH variam, dependendo do alimento, conseguem crescer a pH de 4,5 ajustado com ácido clorídrico, mas não quando ajustado com ácido láctico (ASAE, 2007b; Adams, Moss & McClure, 2016).

As estirpes patogénicas adquiriram fatores de virulência, e causam um vasto leque de doenças como: doença diarreica, septicémia e meningite. Podem ser diferenciadas serologicamente com base nos seus antígenos: somáticos (O), flagelares (H), e capsulares (K).

As estirpes associadas à doença diarreica são agrupadas por patótipos com base nos seus fatores de virulência, mecanismos de patogenicidade e sintomatologia clínica. Fazem parte destes patótipos: *E. coli* enteropatogénicos (EPEC), *E. coli* enterotoxigénicos (ETEC), *E. coli* enteroinvasivos (EIEC), *E. coli* enteroagregativos (EAEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* verotoxigénico (VTEC) também conhecido como produtor de toxina shiga (STEC) que inclui *E. coli* enterohemorrágicos (EHEC) (Willshaw, Cheasty & Smith, 2000; Croxen *et al.*, 2013; European Food Safety Authority [EFSA], 2013; Bundesinstitut für Risikobewertung [BfR], 2020).

4.3.3.3. *Staphylococcus aureus*

As bactérias do género *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos com diâmetro celular que varia entre 0,5 a 1,5 µm que se apresentam aos pares, pequenas cadeias ou em agrupamento com forma de cacho de uva. Pertencem à família *Micrococcaceae*, que se divide nos géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus* e *Planococcus* (Montville, Mathews & Kniel, 2012).

São microrganismos mesófilos com temperaturas ótimas de crescimento entre os 7 °C e os 48 °C, alguns produzem enterotoxinas termorresistentes entre os 10 °C e os 46 °C. As enterotoxinas produzidas por *S. aureus* desenvolvem-se com pH mínimo de 4 e máximo de 10, sendo o pH ideal entre 6 e 7.

As enterotoxinas estafilocócicas conseguem sobreviver a processos térmicos com altas temperaturas, e permanecer nos alimentos sem microrganismos viáveis. *Staphylococcus* spp. pertencem à microbiota normal do homem e de outros animais, estando presentes na pele, mucosas e fossas nasais.

A maioria dos surtos estão relacionados com o consumo de alimentos com toxinas pré-formadas produzidas por *S. aureus*, embora outras espécies como *S. intermedius* e *S. hyicus* também possam causar doença de origem alimentar. Os quadros de intoxicação por *S. aureus* estão associados a alimentos frios e muito manipulados durante a sua preparação. Os principais sintomas são: náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarreia. O período de incubação é em média de 2 a 4 horas (HPA, 2009; de Santana, Beloti, Aragon-alegro, & de Mendonça, 2010; Adams, Moss & McClure, 2016).

4.3.3.4. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus é um microrganismo anaeróbio facultativo, Gram-positivo, formador de esporos, possui catalase e lectinase positivas e oxidase variável consoante as estirpes. São

ubiquitários, a temperatura ótima de crescimento é entre os 30 °C e os 37 °C, embora consigam crescer a temperaturas extremas entre 5 °C e 55 °C (Leyral & Vierling, 2007). A capacidade de esporulação permite-lhes resistir a condições ambientais adversas, como a pasteurização, o aquecimento e a congelação. Os esporos são hidrofóbicos, conseguem aderir a superfícies, e são resistentes à radiação gama utilizada para reduzir patogénicos alimentares, causando obstáculos nas empresas do setor alimentar. São encontrados em vários produtos alimentares como: o arroz e outros alimentos desidratados, carnes, legumes, frutos, grãos e frutos do mar (Kotiranta, Lounatmaa, & Haapasalo, 2000; Granum, 2007). Causam dois quadros clínicos de doença alimentar: síndrome diarreica e síndrome emética. A sintomatologia da síndrome diarreica é semelhante à intoxicação alimentar por *C. perfringens*. A enterotoxina pode ser pré-formada no alimento ou formada no intestino delgado, os sintomas característicos são: diarreia profusa, dor abdominal e náuseas, geralmente têm início 8 a 16 horas após ingestão. A síndrome emética está associada a alimentos como o arroz, a toxina é produzida a temperaturas entre os 25 °C e os 30 °C, os sintomas são semelhantes à intoxicação por *S. aureus*, e incluem náuseas e vômitos, ocasionalmente podem surgir dores abdominais e diarreia, manifestando-se entre 1 a 5 horas após a ingestão (Drobniewski, 1993; Granum, 1997; Granum, 2007; HPA, 2009).

4.3.3.5. *Listeria monocytogenes*

As bactérias do género *Listeria* são aeróbias facultativas, Gram-positivas, têm forma de pequenos bacilos ou cocobacilos, não esporuladas, oxidase negativa e catalase positiva (Leyral & Vierling, 2007).

Listeria monocytogenes é ubiquitária e muito resistente a condições adversas, cresce entre os 0 °C e 45 °C, sendo o seu crescimento mais lento a baixas temperaturas, é inativada quando exposta a temperaturas superiores a 50 °C. Os valores de pH variam entre 4,4 e 9,6. O valor mínimo de a_w é 0,93 e o ótimo a 0,97, certas estirpes conseguem crescer a valores tão baixos como 0,90 e sobreviver a valores como 0,83 (Swaminatham, Cabanes, Zhang & Cossart, 2007). Certos produtos prontos para consumo são considerados de alto risco na transmissão de listeriose, encontrando-se entre eles o peixe, o marisco e os crustáceos. São considerados como grupo de risco: imunodeprimidos, gestantes, neonatos e idosos. Os sintomas de listeriose são mais severos neste grupo e podem incluir: septicémias, meningites e meningoencefalite, com mortalidade compreendida entre os 20 e 30%. Em gestantes, principalmente no terceiro trimestre de gravidez, a infeção pode apresentar apenas sintomas gripais leves (febre, e/ou dores musculares com ou sem diarreia) mas no feto provoca consequências graves, podendo resultar

em aborto ou nado morto (Swaminathan *et al.*, 2007). Os sintomas mais comuns da listeriose em adultos saudáveis são sintomas gripais (McSwane, Rue & Linton 2000) e na listeriose gastrointestinal normalmente ocorre febre e diarreia, entre as 18 e as 27 horas após ingestão (Swaminathan *et al.*, 2007).

4.3.3.6. *Vibrio* spp.

Pertencem à família *Vibrionaceae*, são anaeróbios facultativos, bacilos Gram-negativos, frequentemente são curvados e móveis por flagelos. Existem cerca de 35 espécies do género *Vibrio*, das quais 12 são consideradas patogénicas para o homem (ASAE, 2006). Encontram-se em ambientes estuarinos, são mais frequentes em meses quentes, e em pescado proveniente de águas quentes. Estão associadas a uma grande variedade de peixes, mariscos e moluscos crus, e causam infeções alimentares quando os alimentos contaminados são ingeridos crus ou insuficientemente cozinhados (McSwane *et al.*, 2000). As espécies de *Vibrio* patogénicas associadas a alimentos são: *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. hollisae*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* (Oliver & Kapter, 2007), sendo mais frequentes no pescado as espécies *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, e *V. vulnificus* (McSwane *et al.*, 2000). Caracterizam-se como grupo de risco: diabéticos, doentes hepáticos e imunodeprimidos, nos quais a sintomatologia se apresenta mais severa (ASAE, 2006).

V. parahaemolyticus é a espécie mais comum em infeções gastrointestinais relacionadas com o consumo de marisco e peixe cru (Oliver & Kapter, 2007). É uma bactéria halófila, que cresce em ambientes com concentrações de NaCl entre os 0,5% e 0,8%, com crescimento máximo a 3%. Consegue crescer num intervalo de temperatura entre 5 °C e 43 °C, sendo a temperatura ótima a 37 °C com um tempo de geração muito curto entre 8 e 9 minutos. Não é resistente a temperaturas elevadas, é destruído quando exposto a temperaturas superiores a 63 °C e por desidratação. Quando exposto a temperaturas de refrigeração é sensível, diminuindo o número de microrganismos viáveis, embora à congelação não seja tão sensível. Os valores ótimos de pH são compreendidos entre 5 e 11 apresentando uma taxa máxima de crescimento entre 7,5 e 8,5. Em relação à a_w consegue crescer em ambientes com a_w mínima de 0,94. Os sintomas aparecem 4 a 96 horas após o consumo, os mais comuns são diarreia e dores abdominais, podendo ser seguidos de náuseas, vômitos, dores de cabeça e febre. Os sintomas duram normalmente entre 3 a 5 dias (ASAE, 2006; Oliver & Kapter, 2007; FAO/WHO, 2011).

V. cholerae cresce em ambientes com temperaturas entre os 10 °C e os 43 °C, com temperatura ótima entre 30 °C e 37 °C. É destruído por pasteurização, radiação ionizante e

quando exposto a temperaturas superiores a 70 °C. O pH ótimo é de 7,6 e cresce num intervalo de 5 a 9,6. O valor mínimo de a_w que permite o crescimento é de 0,97 sendo o ótimo a 0,98. Tolerar concentrações de NaCl máximas de 4%, mas o seu crescimento é favorecido a baixas concentrações de NaCl. Os sintomas iniciais são diarreia ligeira, dores abdominais e anorexia, que podem ser seguidos de diarreia profusa e aquosa, surgem 6 horas a 5 dias após a ingestão, e a recuperação pode levar entre 1 e 6 dias dependendo do nível de desidratação (ASAE, 2006).

V. vulnificus cresce entre 8 °C e 43 °C, com temperatura ótima de crescimento 37 °C, é sensível a baixas e elevadas temperaturas e à radiação ionizante. Os valores de crescimento de pH estão compreendidos entre 5 e 10, com máximo de crescimento a pH 7,8. O valor mínimo de a_w é 0,96 e o ótimo a 0,98. É halófilo, crescendo em ambientes com concentrações de NaCl entre os 0,5 e 5%, apresentando crescimento máximo a concentrações de 2,5%. Os sintomas mais severos desta infeção são septicémias e lesões cutâneas, e os mais comuns são febre e arrepios, ocasionalmente náuseas, dores abdominais, diarreia, vômitos e hipotensão. A sintomatologia aparece cerca de 16 a 38 horas após a ingestão. A taxa de mortalidade varia entre 40 e 60% para o grupo de risco (McSwane *et al.*, 2000; ASAE, 2006).

V. parahaemolyticus e *V. vulnificus* estão naturalmente associados a certas espécies de pescado provenientes de águas com elevadas concentrações de sal. *V. parahaemolyticus* pode ser transmitido através de manipuladores assintomáticos após várias semanas do desaparecimento dos sintomas, através de contaminação fecal, enquanto *V. cholerae* é associado a pescado proveniente de águas poluídas contaminadas com material de origem fecal e higiene deficiente, podendo ocorrer contaminação cruzada no contacto com manipuladores infetados (McSwane *et al.*, 2000; ASAE, 2006).

5. Microrganismos indicadores

5.1. Microrganismos aeróbios mesófilos totais

Com a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais é determinada a carga microbiana total presente no alimento e avaliada a sua qualidade geral, mas não a sua segurança. Alimentos com valores de contagens superiores ao espectável, podem indicar possíveis falhas de higiene e no controlo de temperatura. Nesses casos devem ser efetuadas análises adicionais para identificação dos agentes que possam ter dado origem a esses valores. Produtos alimentares prontos para consumo crus como o *sushi*, provavelmente apresentam valores elevados, devido à inexistência de tratamento térmico (HPA, 2009).

5.2. *Enterobacteriaceae*

Os microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* são bastonetes Gram-negativos, encontram-se na microbiota intestinal do homem e animais, solo, água e plantas, pelo que facilmente se compreende que bactérias pertencentes a esta família entrem na cadeia alimentar. Alguns géneros são responsáveis por causar doenças transmitidas por alimentos e outros também causam deterioração e contribuem para perdas económicas substanciais e desperdício de alimentos (Baylis, Uyttendaele, Joosten & Davies, 2011).

Fazem parte desta família bactérias como *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp. A presença destes microrganismos em alimentos tratados termicamente pode indicar tratamento térmico insuficiente ou contaminação após o processamento. Em alguns produtos alimentares crus, como saladas e vegetais normalmente são encontrados altos níveis destas bactérias, a higienização pode reduzir o número de bactérias, mas não as elimina completamente. Produtos crus com elevadas contagens podem indicar más práticas de higiene e controlos de temperatura inadequados (Sousa, 2006; HPA, 2009).

5.3. *Escherichia coli*

O agente *Escherichia coli*, pertence à família *Enterobacteriaceae* e é um habitante normal do trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente (Gonzalez-Escalona, Meg & Doyle, 2019). Deste modo, é considerado o melhor indicador de contaminação fecal e do cumprimento das boas práticas de higiene (Jay *et al.*, 2005; Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge [INSA], 2019).

6. O *sushi* como fonte de infeção ou intoxicação alimentar

O consumo de *sushi* tem sido associado a vários surtos de toxinfecções alimentares em vários países.

Em Hong Kong entre 1997 e 1999, 3% dos surtos de toxinfecções alimentares foram associados ao consumo de *sushi* e *sashimi*, no total 142 pessoas foram afetadas. Os microrganismos identificados foram: *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. (FEHD, 2000).

Em 2004 no Reno, Nevada, Estados Unidos da América (EUA), foi identificado um surto de infeção alimentar por *Escherichia coli* enterotoxigénica, e outro surto por *Salmonella* em 20 estados, ambos devido ao consumo de *sushi* (Liang *et al.*, 2016). Entre 2001 e 2007 na Austrália, foram relatados 10 surtos, 84 pessoas foram afetadas, das quais 7 foram

hospitalizadas, tendo sido identificados como agentes causais *E. coli* e *Salmonella*, sendo os surtos por consumo de *sushi* 1,4% do total de surtos notificados (NSW Food Authority, 2008).

Ainda nos EUA, em 2012, foi declarado um surto por consumo de fatias de atum contaminadas com *Salmonella*, 28 estados foram afetados e no distrito de Columbia, foram notificadas 425 pessoas como infetadas, das quais 55 foram hospitalizadas. Em 2015, foi declarado outro surto nos EUA, que atingiu 9 estados americanos devido ao consumo de *sashimi* de atum, contaminado com uma estirpe de *Salmonella*, 53 pessoas foram afetadas, das quais 10 receberam tratamento hospitalar (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2012).

7. Objetivos

Foram objetivos gerais deste trabalho:

- Avaliar a qualidade microbiológica de peças de *sushi* prontas para consumo, comercializadas em duas superfícies comerciais distintas: um hipermercado e um restaurante especializado em cozinha japonesa, na área de Lisboa.
- Comparar duas marcas de *sushi*, pronto para consumo, designadas por hipermercado e restaurante, de acordo com o perfil microbiano previamente determinado.
- Comparar a qualidade microbiológica das peças de *sushi* analisadas relativamente à variedade de peixe presente.

Foram objetivos específicos deste trabalho:

Analisar a qualidade microbiológica de peças de *sushi*, prontas para consumo, comercializadas em duas superfícies comerciais distintas, através da análise dos seguintes parâmetros:

- Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos
- Contagem de *Enterobacteriaceae*
- Contagem de *Escherichia coli*
- Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*
- Contagem de *Bacillus cereus*
- Pesquisa de *Salmonella* spp.
- Pesquisa de *Listeria monocytogenes*
- Pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio vulnificus*

8. Materiais

8.1. Amostragem

Foram recolhidas no total, 62 amostras de *sushi* em duas superfícies comerciais distintas na área de Lisboa, 31 amostras foram provenientes de um hipermercado e 31 amostras de um restaurante, ambas no conceito de *take-away*. Os ingredientes que compunham as amostras, assim como o número de amostras de cada variedade de pescado (A- 25 amostras de atum; B- 31 amostras de salmão e C- 6 amostras de camarão) encontram-se descritos na tabela 4.

Tabela 4- Número de amostras de cada variedade de pescado analisadas e restantes ingredientes que compunham as amostras.

Superfície comercial	Variedade de pescado	Nº de amostras analisadas	Ingredientes
Hipermercado	A	11	AJT; atum; alface; pepino; alga <i>nori</i> , sementes de sésamo.
		2	AJT; atum; alga <i>nori</i> .
	B	1	AJT; salmão; alga <i>nori</i> .
		2	AJT; salmão; pepino; manga; alga <i>nori</i> .
		11	AJT; salmão; pepino; manga; alga <i>nori</i> ; sementes de sésamo.
	C	4	AJT; camarão; pepino; alface; abacate; alga <i>nori</i> ; sementes de sésamo
Restaurante	A	9	AJT; atum; rúcula; alga <i>nori</i> ; sementes de sésamo.
		3	AJT; atum; alga <i>nori</i> .
	B	5	AJT; salmão; manga; ovas; alga <i>nori</i> ; sementes de sésamo.
		10	AJT; salmão; camarão; abacate; alga <i>nori</i> .
		2	AJT; salmão; alga <i>nori</i> .
	C	2	AJT; camarão; alga <i>nori</i> .

AJT- Arroz japonês temperado com vinagre e vinho de arroz, açúcar e sal; A-atum; B-salmão; C-camarão.

A recolha das amostras foi realizada durante dois meses, entre maio e junho de 2019, às segundas e quartas-feiras, entre as 12 e as 14 horas. As recolhas foram realizadas pela autora, de forma incógnita comportando-se como consumidora, para não incitar qualquer alteração dos métodos de higiene e segurança alimentar por parte dos manipuladores durante a preparação.

Em ambas as superfícies comerciais as amostras foram preparadas na hora da recolha por parte dos manipuladores.

As amostras foram transportadas dentro das embalagens de origem, fornecidas pelos estabelecimentos, destinadas ao *take-away*. O transporte para o laboratório foi efetuado em refrigeração, recorrendo a malas isotérmicas, com temperatura controlada entre 1 °C e 8 °C, durante um período máximo de 30 minutos após a colheita.

No laboratório foram identificadas com: número de amostra, nome do estabelecimento de onde eram provenientes, ingredientes que compunham a amostra, hora e data da colheita, assegurando assim a sua rastreabilidade ao longo de todo o processo. Posteriormente foram conservadas em frigorífico a temperatura controlada, de 3 °C $\pm$ 2 °C, até à realização das respetivas análises microbiológicas, que ocorreram cerca de 18 a 20 horas após a recolha.

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia dos Alimentos do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, todo o processo foi efetuado respeitando as regras descritas na norma ISO 7218:2007/Amd 1:2013 (ISO 7218, 2007/ Amd 1 2013).

8.2 Análises microbiológicas realizadas:

Em cada amostra de *sushi* analisada foi realizada a contagem e a pesquisa de microrganismos patogénicos e indicadores, com um total de oito parâmetros por amostra: contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Estafilococos* coagulase positiva, *Bacillus cereus*, e pesquisa de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., e *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio vulnificus*.

8.3. Meios de cultura e reagentes utilizados

8.3.1. Meios utilizados como diluentes e pré-enriquecimento

8.3.1.1. Água Peptonada Tamponada

Para preparação da diluição-mãe (10^{-1}), e como meio de pré-enriquecimento não seletivo para pesquisa de *Salmonella* spp., foi utilizado o caldo *Buffered Peptone Water (BPW)* (bioMerieux®). Este é um meio não seletivo, rico em nutrientes, constituído por: peptona, cloreto de sódio, fosfato de sódio, fosfato de potássio e com pH de 7.0 ± 0.2 a 25 °C, que permite a regeneração e a multiplicação de células lesadas, expostas a condições adversas, ou que se

encontrem presentes em baixo número, antes de passarem para um meio seletivo. Fornece um meio ideal ao crescimento da maioria dos microrganismos que se encontram nos alimentos, principalmente o crescimento de *Salmonella* spp. (Merck, 2010; bioMérieux, 2016a).

8.3.1.2. Caldo *Half-Fraser*

Na diluição da amostra para pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi utilizado o caldo *Half-Fraser*, um meio de pré-enriquecimento seletivo, rico em nutrientes, composto por uma mistura de peptonas, cloreto de lítio, ácido nalidíxico e acriflavina, que o tornam um meio seletivo, inibindo a microbiota acompanhante, e um tampão que mantém o pH próximo da neutralidade, permitindo assim a regeneração e o crescimento de bactérias expostas a condições de stress, antes de passar para o meio seletivo *Fraser* (bioMérieux, 2014a).

8.3.1.3. Água Peptonada Alcalina

Na pesquisa de *Vibrio* spp. a Água Peptonada Alcalina (APA) (Oxoid™) foi utilizada para diluição da amostra, como meio de pré-enriquecimento, e de enriquecimento secundário. É composto por peptonas, cloreto de sódio numa concentração de 10 g por litro, que lhe proporciona um elevado pH (8,5) e uma elevada concentração de sódio, condições favoráveis ao crescimento de *Vibrio* spp. (Merck, 2010).

8.3.1.4. Triptona Sal

Para a realização das diluições decimais, foi utilizada a Triptona Sal (TS) (Biokar Diagnostics™). Este é um diluente composto por triptona que assegura a viabilidade e a reparação de microrganismos expostos a condições ambientais adversas, e por cloreto de sódio que o torna numa solução isotónica mantendo o equilíbrio osmótico do meio. Possui pH de $7,0 \pm 0,2$ a 25 °C (BIOKAR Diagnostics, 2018).

8.3.2. Meios de enriquecimento seletivo

8.3.2.1. Caldo SX2

O caldo SX2 (bioMérieux®) foi utilizado como enriquecimento seletivo na pesquisa de *Salmonella* spp., a composição deste caldo favorece o seu crescimento e inibe a microbiota competitiva, aumentando assim as hipóteses de deteção (bioMérieux, 2014b).

8.3.2.2. Caldo *Fraser*

O caldo *Fraser* foi utilizado como enriquecimento seletivo na pesquisa de *Listeria monocytogenes*, este caldo contém o dobro da composição de antibióticos e de acriflavina relativamente ao caldo *Half-Fraser* (bioMérieux, 2014c).

8.3.3. Meios de cultura utilizados no equipamento TEMPO®

Para a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais (AC), foi utilizado o meio TEMPO® AC, desenvolvido para obter resultados análogos aos da norma EN ISO 4833-1, é composto por elementos nutritivos, suplementos de crescimento de origem porcina/bovina, substrato, componente anti-espuma e com pH de 7,2 (bioMérieux, 2014d).

Na contagem de *Enterobacteriaceae* (EB) foi utilizado o meio TEMPO® EB sendo que, este meio foi desenvolvido para obter resultados análogos aos da norma ISO 21528-2, é composto por: peptonas vegetais, açúcares, cloreto de sódio, suplementos de crescimento, desoxicolato de sódio (bovino e ovino), sistema tampão, indicador de pH fluorescente, componente anti espuma e com pH de 7,4 (bioMérieux, 2019a).

Para a contagem de *Escherichia coli* (EC) foi utilizado o meio TEMPO® EC, o qual foi desenvolvido para obter resultados análogos aos da norma EN ISO 16649-2. É composto por: Bio-Soiase e elementos nutritivos, suplemento de crescimento, 3-(N-morfolino) propanesulfónico (MOPS) sal de sódio, MOPS ácido, Desoxicolato de sódio (bovino e ovino), substrato e reguladores enzimáticos, sistema anti espuma e com pH de 7,4 (bioMérieux, 2018a).

Na contagem de *Estafilococos* coagulase positiva (STA) foi utilizado o meio TEMPO® STA desenvolvido para obter resultados análogos aos da norma EN ISO 6888-2, é composto por: peptonas animais (bovinas e porcinas), peptonas vegetais, açúcares, suplementos de crescimento, sistema tampão, agentes seletivos para estafilococos, indicador de pH fluorescente, componente anti espuma e com pH de 7,2 (bioMérieux, 2019b).

E por fim, na contagem de *Bacillus cereus* (BC) foi utilizado o meio TEMPO® BC, desenvolvido para obter resultados análogos aos da norma EN ISO 7932, é composto por: elementos nutritivos, suplementos de crescimento, sistema tampão, agentes seletivos, substratos, substância anti espuma e com pH de 7,7 (bioMérieux, 2019c).

8.3.4. Meios sólidos

8.3.4.1. Xylose-Lysine-Desoxycholate

O meio *Xylose-Lysine-Desoxycholate* (XLD) é um meio seletivo e diferencial, utilizado para isolar e diferenciar *Salmonella* e *Shigella*. O desoxicolato presente no meio, age como agente inibidor de coliformes, sem interferir com o crescimento de *Salmonella* e *Shigella*. A fermentação da xilose, a descarboxilação da lisina e a produção de ácido sulfídrico (H₂S), são reações que permitem uma diferenciação primária entre *Shigellae* e *Salmonellae*, de outras bactérias patogênicas. Formam colônias de cor avermelhada. As estirpes de *Salmonella* produtoras de ácido sulfídrico podem dar origem a colônias com centro preto e brilhante ou totalmente pretas (bioMérieux, 2016b).

8.3.4.2. IBISA® Agar

O IBISA® Agar é um meio seletivo utilizado para detecção e confirmação de *Salmonella* spp., a mistura de substratos cromogênicos presentes no meio permite a diferenciação entre *Salmonella* e outras *Enterobacteriaceae*. As colônias adquirem uma coloração verde. É o meio de isolamento secundário escolhido pelo laboratório para a confirmação de resultados positivos no sistema VIDAS® (bioMérieux, 2015a).

8.3.4.3. Triple Sugar Iron

O meio *Triple Sugar Iron* (TSI) permite a diferenciação de *Enterobacteriaceae*, de acordo com a capacidade de fermentação da lactose, sacarose e glucose, e com a produção de gás e ácido sulfídrico. A reação de *Salmonella* em meio TSI caracteriza-se por adquirir rampa/inclinação vermelha e fundo amarelo, com ou sem produção de gás. No caso de estirpes produtoras de ácido sulfídrico, ocorre escurecimento do meio (Oxoid, 2011a).

8.3.4.4. Agar *Listeria* segundo Ottaviani & Agosti

O Agar *Listeria* segundo Ottaviani & Agosti (ALOA) é um meio seletivo, que permite isolar e diferenciar *Listeria* spp de *Listeria monocytogenes*. Foi utilizado como meio de isolamento seletivo na confirmação de resultados positivos do sistema VIDAS®, possui um substrato cromogênico, que permite a detecção da enzima β -glucosidase dando origem a colônias azuis características de *Listeria* spp. No caso da *Listeria monocytogenes*, as colônias formam um halo branco opaco devido à atividade de uma fosfolipase. A presença de cloreto de lítio e

antibióticos (ácido nalidíxico, ceftazidima e polimixina B), são componentes que conferem seletividade ao meio (Condalab, 2019).

8.3.4.5. Oxford Agar

O Oxford Agar foi o meio de enriquecimento secundário utilizado na pesquisa de *Listeria monocytogenes*. É um meio de isolamento seletivo, composto por esculina, citrato férrico amoniacal e cloreto de lítio. A esculina é hidrolisada por *Listeria* spp. dando origem a colônias com halo negro em volta. Tem como agentes inibidores, cloreto de lítio, acriflavina, cefotetan, anfotericina B, sulfato de colistina, cicloheximida e fosfomicina (Oxoid, 2011b).

8.3.4.6. Tryptone Soya Agar

O meio *Tryptone Soya Agar* (TSA) é um meio de isolamento não seletivo, constituído por triptona, peptona, lípidos, hidratos de carbono e cloreto de sódio. É um meio utilizado para o isolamento de colônias suspeitas, na confirmação de resultados positivos de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* (bioMérieux, 2015b).

8.3.4.7. Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose Agar

O meio *Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose Agar* (TCBS) (Oxoid™) foi utilizado como meio de isolamento seletivo na pesquisa de *Vibrio* spp., é um meio de cultura seletivo para *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, e a maioria das espécies de *Vibrio* spp.

Na sua composição contém uma elevada concentração de cloreto de sódio, citrato de sódio e tiosulfato de sódio, e um pH de $8,6 \pm 0,2$. Este meio contém uma composição ideal, para o crescimento de bactérias que necessitam de concentrações salinas elevadas, como é o caso de *Vibrio* spp. A presença de sais biliares, a alcalinidade do meio, e as altas concentrações de sódio inibem o crescimento da maior parte da flora acompanhante. As espécies *V. cholerae* e *V. alginolyticus*, por fermentarem a sacarose dão origem a colônias amarelas, enquanto o *V. parahaemolyticus* e o *V. vulnificus*, originam colônias azuis ou verdes (Oxoid, 2012).

8.3.4.8. Vibrio Chromogenic Agar

O meio *Vibrio Chromogenic Agar* (VCA) (CHROMagar™) foi o meio utilizado como isolamento secundário na pesquisa de *Vibrio* spp. É um meio cromogénico, que permite a deteção e diferenciação das espécies: *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae* e *V.*

alginolyticus. É constituído por peptona, extrato de levedura, elevada concentração de sódio, 51,4 g/L, e o pH $9.0 \pm 0,2$ é ideal para o crescimento destas bactérias.

Os substratos cromogénicos presentes no meio, permitem a clara diferenciação entre as espécies *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, ambos não fermentadores da sacarose, e adquirem colorações distintas neste meio, ao contrário do que acontece no meio TCBS. Assim, *V. parahaemolyticus* forma colónias cor malva (rosa-vermelho), *V. vulnificus* e *V. cholerae* colónias verde-azuis e azuis-turquesa, *V. alginolyticus* colónias brancas a creme, evitando assim a interferência de deteção entre as espécies (Chromagar, 2019).

8.4. Descrição dos sistemas automatizados

8.4.1. Equipamentos do sistema TEMPO®

O sistema TEMPO® é composto pelo programa informático TEMPO® *Prep*, onde os códigos de barras dos frascos de meio e as cartas são introduzidos, e associados à amostra a testar, assegurando assim a sua rastreabilidade até ao fim do processo. Na figura 10 estão representados os equipamentos do sistema TEMPO®.

Para a realização das análises microbiológicas no sistema TEMPO®, foram necessários os meios de cultura desidratados e as respetivas cartas (figura 10). Após a devida preparação das amostras, os frascos são colocados juntamente com as cartas dentro do equipamento TEMPO® *Filler* (figura 10) onde o líquido é transferido por vácuo para a respetiva carta que é selada no fim do processo.

Cada carta é composta por 48 poços no total, com três volumes diferentes, 3 séries de 16 poços pequenos, médios e grandes, com uma diferença de volume de um log entre cada série de poços. As cartas são seladas hermeticamente no final da transferência, a fim de evitar qualquer contaminação posterior da amostra. De seguida, são incubadas às temperaturas e tempos recomendados pelo fabricante, que dependem do microrganismo em pesquisa.

No decorrer da incubação, os microrganismos presentes nas cartas degradam os substratos presentes nos meios de cultura, e permitem o aparecimento de um sinal fluorescente. Quando introduzidas no equipamento TEMPO® *Reader* (figura 10), que se encontra ligado a um computador, o TEMPO® *Reader* realiza um cálculo segundo o método do Número Mais Provável (NMP), em função do número e do tipo de poços positivos presentes e apresenta os resultados dos testes efetuados (bioMérieux, 2014d).



Figura 10 - Representação dos equipamentos do sistema TEMPO®. **Fonte:** original da autora.

8.4.2. Sistema VIDAS®

O sistema VIDAS® foi utilizado na pesquisa de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. Para utilização deste sistema foram necessários os respetivos “kit’s” VIDAS® SLM e VIDAS® LMO2, compostos por uma barrete e um cone (SPR®) utilizados para cada uma das amostras em estudo.

O método imunoenzimático VIDAS® permite a deteção de antígenos de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, caso se encontrem presentes na amostra, pela técnica ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*).

O equipamento é composto por 5 secções independentes, cada secção com 6 divisórias para colocação de barretes. O equipamento encontra-se ligado a um computador, onde as amostras são identificadas, e assinalado o teste que se pretende efetuar no equipamento, neste caso, teste *Salmonellae* ou *Listeria monocytogenes*, os resultados são impressos automaticamente no fim do processo.

O cone (SPR®), está coberto no seu interior por anticorpos de *Salmonella* spp. (kit VIDAS® SLM) e anticorpos de *Listeria monocytogenes* (kit VIDAS® LMO2), adsorvidos na sua superfície, é descartável e serve tanto de fase sólida como para suporte da pipetagem. Os restantes reagentes necessários ao teste, estão prontos para serem utilizados, e encontram-se pré-repartidos nas barretes seladas dos respetivos kit’s, o meio de reação é aspirado e dispensado várias vezes pelo cone. Todas as etapas do teste são efetuadas automaticamente pelo equipamento.

Uma alíquota do caldo de enriquecimento seletivo é colocada dentro do único orifício aberto e próprio da barrete, os antígenos presentes, irão fixar-se aos anticorpos, no interior do cone, as etapas de lavagem eliminam os elementos não fixados. Em seguida, os anticorpos conjugados com a fosfatase alcalina são aspirados e dispensados no cone, e fixam-se a

quaisquer antígenos que já se encontrem fixados aos anticorpos da parede do cone. Novas etapas de lavagem eliminam o conjugado não fixado.

Na etapa final de detecção, o substrato, 4-metilumbeliferil fosfato, é submetido a ciclos de aspiração e dispensação do cone. A enzima do conjugado catalisa a reação de hidrólise desse substrato num produto final fluorescente (fosfato de 4-metil-umbeliferona), cuja fluorescência é medida a 450 nm. Terminado o teste, os resultados são analisados automaticamente pelo sistema que fornece um valor de teste para cada amostra. Este valor é comparado com as referências internas (limiares) e cada resultado é interpretado como positivo ou negativo (bioMérieux, 2018b; bioMérieux, 2018c).

8.4.3. Equipamento VITEK® MS

O equipamento VITEK® MS é um sistema automatizado, utilizado em conjunto com outros equipamentos para identificação de microrganismos, através da tecnologia MALDI-TOF (Dessorção Ionização Assistida por Matriz - Tempo de Voo). A tecnologia de espectrometria de massa permite uma identificação clara do microrganismo a nível da espécie, género e família através de uma base de dados alargada de espécies clinicamente relevantes.

O slide é preparado com a amostra e introduzido num ambiente de vácuo elevado, de seguida um disparo de laser preciso ioniza a amostra, e uma ‘nuvem’ de proteínas é libertada e acelerada por meio de uma carga elétrica. Após passar através de um eletrodo de anel, o tempo de voo das proteínas é registado por um detetor, e medido por meio de uma fórmula através do tempo registado. As proteínas são detetadas por um sensor que cria um espectro que representa a composição proteica de cada amostra, e são identificados os microrganismos em questão (bioMérieux, 2016c).

8.5. Materiais utilizados em cada pesquisa:

8.5.1. Meios de cultura, reagentes e materiais utilizados na contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, *Stafilococos*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*:

- Caldo BPW
- Sacos TEMPO® (bioMérieux®)
- Material esterilizado (pinça, colher e tesoura)
- Balança digital PM2000 (Mettler Instruments, Zurique, Suíça)
- Homogeneizador peristáltico (Stomacher 400 Circulator, Seward®)
- Triptona sal

- Pipetador automático (accu-jet pro, BrandTecH[®])
- Pipetas
- Meios de cultura desidratados e respectivas cartas do sistema TEMPO[®] (bioMerieux[®])
- Água destilada estéril
- Vórtex (RX3 Vortex Mixer, VELP Scientifica[®])
- Equipamentos do sistema TEMPO[®] (bioMerieux[®])

8.5.2. Meios de cultura, reagentes e materiais utilizados na pesquisa de *Salmonella* spp.:

- Caldo BPW
- Sacos TEMPO[®]
- Material esterilizado (pinça, colher e tesoura)
- Balança digital
- Homogeneizador peristáltico
- Pipeta
- Caldo SX2 (bioMerieux[®])
- Vórtex
- Equipamento “*Heat and Go*” (sistema análogo ao banho maria) modelo DB-3D, (Techne Dri-Block[®] heater)
- “kit” VIDAS[®] SLM (bioMerieux[®])
- Micropipeta
- Equipamento VIDAS[®] (bioMerieux[®])

8.5.3. Meios de cultura, reagentes e materiais utilizados na pesquisa de *Listeria monocytogenes*:

- Caldo *Half-Fraser*
- Sacos TEMPO[®]
- Material esterilizado (pinça, colher e tesoura)
- Balança digital
- Homogeneizador peristáltico
- Pipeta
- Caldo *Fraser*
- Vórtex

- “kit” VIDAS® LMO2 (bioMerieux®)
- Micropipeta
- Equipamento VIDAS®

8.5.4. Reagentes e meios de cultura utilizados na pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio vulnificus*:

- APA
- Sacos TEMPO®
- Material esterilizado (pinça, colher e tesoura)
- Balança digital
- Homogeneizador peristáltico
- Pipetador automático
- Pipeta
- Vórtex
- Meios de cultura: VCA e TCBS
- Ansas
- Teste Oxidase (BD BBL™)
- Equipamento VITEK® MS (bioMerieux®)

9. Metodologia

9.1. Metodologia realizada na preparação das amostras para análise

A preparação das amostras para análise teve como finalidade torná-las aptas para a detecção, identificação e/ou quantificação da carga microbiana presente por unidade de massa ou de volume.

Foram identificados sacos esterilizados, próprios para recolha de alimentos com o número de amostra e a data de análise.

O exterior das embalagens de origem, foi desinfetado com o auxílio de papel absorvente embebido em álcool a 70%, em ambiente de assepsia recorrendo ao bico de Bunsen. Após a desinfecção das embalagens procedeu-se à sua abertura, e transferência das amostras para os respetivos sacos de recolha, com o auxílio de uma pinça esterilizada, por amostra. Em seguida, com material esterilizado, foram homogeneizadas e transferidas 25 g de amostra dos sacos de recolha, novamente com auxílio de material esterilizado, para cada saco TEMPO®,

devidamente identificados com: número de amostra, hora e data de análise e respectiva pesquisa (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ou *Vibrio* spp.). Após a pesagem, foram adicionados os diluentes destinados a cada pesquisa, e os sacos foram devidamente homogeneizados, em homogeneizador peristáltico durante 60 segundos à velocidade de 230 rotações por minuto (rpm).

Na pesagem para pesquisa de *Salmonella* spp. foi realizada a diluição decimal da amostra na proporção 1/10 com o diluente *BPW*, obtendo-se assim a diluição 10^{-1} , esta suspensão foi utilizada, como meio de pré-enriquecimento na pesquisa de *Salmonella* spp. e na contagem de microrganismos no sistema TEMPO®.

Para a pesquisa de *Listeria monocytogenes*, foi adicionado o diluente *Half-Fraser* na proporção 1/10, após a pesagem da amostra, como meio de pré-enriquecimento.

Na pesquisa de *Vibrio* spp. foi adicionada *APA* na proporção 1/10 após a pesagem da amostra, para diluição e como meio de pré-enriquecimento para a pesquisa. Na tabela 5 encontram-se descritos os diluentes, respectivos volumes e peso da amostra para cada ensaio.

Tabela 5 – Diluentes, volumes e peso da amostra utilizado em cada ensaio.

Análise Microbiológica	Peso da amostra	Meio utilizado como diluente e volume
Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. Contagem de: AC, EB, EC, STA e BC	25 g	<i>BPW</i> 225 mL
Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	25 g	<i>Half-Fraser</i> 225 mL
Pesquisa de <i>Vibrio</i> spp.	25 g	<i>APA</i> 225 mL

AC- microrganismos aeróbios mesófilos; **EB**- *Enterobacteriaceae*; **EC**- *Escherichia coli*; **STA**- *Stafilococcus coagulase positiva*; **BC**- *Bacillus cereus*.

9.2. Metodologia realizada na preparação das diluições decimais:

As diluições decimais têm como finalidade, reduzir o número de microrganismos presentes por unidade de volume semeado e permitir a contagem de ufc após o tempo de incubação.

Este método baseia-se na adição de 1 mL da suspensão-mãe (10^{-1}) a um tubo com 9 mL de TS, obtendo-se assim a diluição 10^{-2} , esta serve de base para a preparação da diluição 10^{-3} , sendo transferido 1 mL do tubo com a diluição 10^{-2} para outro tubo com 9 mL de TS, resultando na diluição 10^{-3} , e da 10^{-3} é transferido 1 mL para 9 mL de TS obtendo-se a diluição 10^{-4} e assim sucessivamente. As diluições decimais sucessivas foram realizadas até à diluição

10^{-4} de acordo com o grau de contaminação esperado. A representação esquemática desta metodologia encontra-se presente na figura 11.

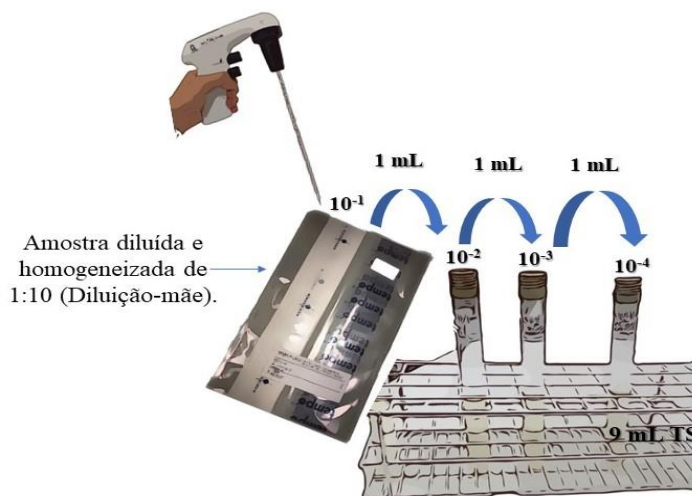


Figura 11 - Ilustração esquemática das diluições decimais sucessivas. **Fonte:** original da autora.

9.3. Metodologia realizada na contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais (AC), *Enterobacteriaceae* (EB), *Escherichia coli* (EC), *Estafilococos* (STA) e *Bacillus cereus* (BC):

Para a contagem dos microrganismos acima mencionados pelo método TEMPO[®] procedeu-se à hidratação dos meios de cultura presentes nos frascos, com água destilada estéril. Todos os frascos foram hidratados com 3 mL de água destilada estéril, exceto o frasco para contagem de AC, hidratado com 3,9 mL. A representação esquemática desta metodologia encontra-se presente na figura 12.

Após a hidratação e homogeneização dos meios, foi realizada a transferência de 0,1 mL da suspensão-mãe para o frasco de AC e 1 mL para os restantes frascos, e foram novamente convenientemente homogeneizados (figura 12).

Posteriormente, os frascos foram colocados juntamente com as respetivas cartas dentro do equipamento TEMPO[®] Filler (figura 12). Após o procedimento, foram incubadas à temperatura e durante o número de horas recomendadas pelo fabricante, que se encontram descritos abaixo na tabela 6. Após incubação, as cartas foram colocadas dentro do equipamento TEMPO[®] Reader (figura 12) onde foram lidas, e os resultados interpretados automaticamente. Na contagem de AC foi ainda utilizada a diluição decimal 10^{-4} , e na contagem de EB a diluição decimal 10^{-3} .

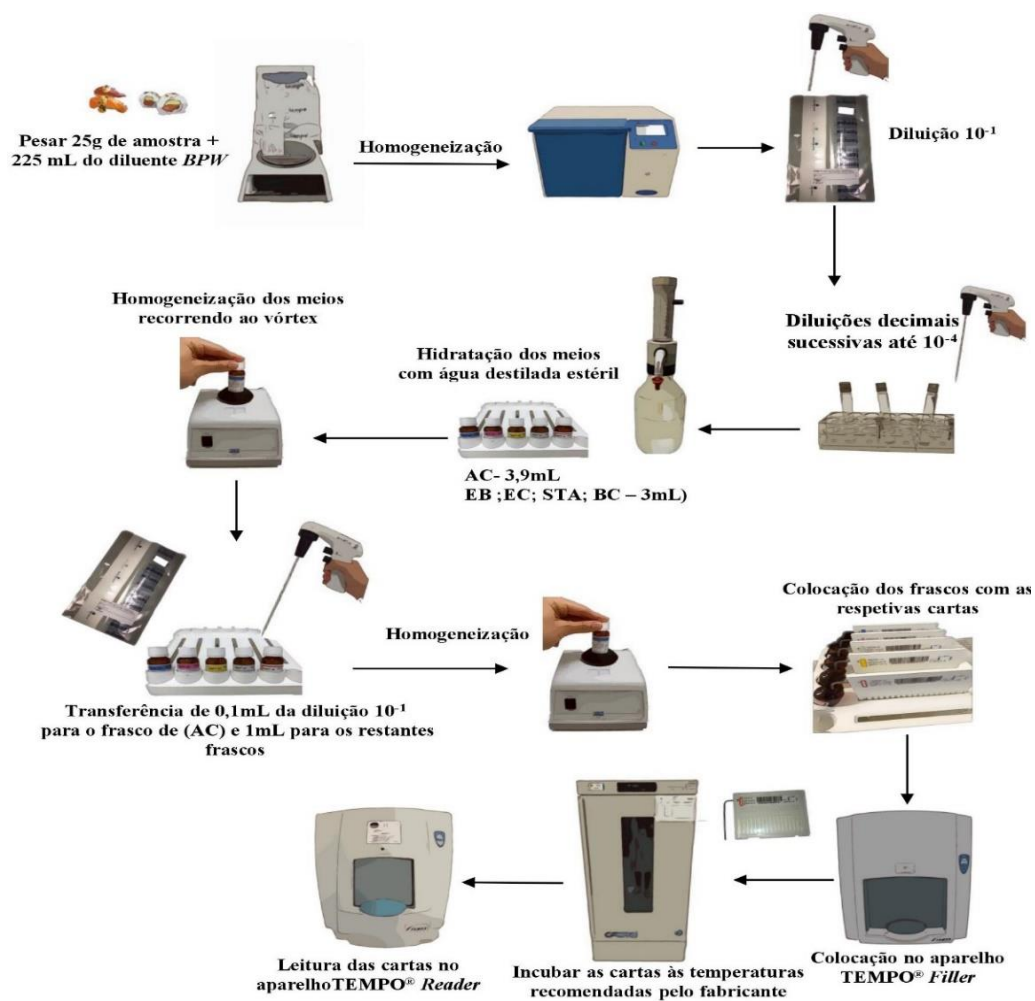


Figura 12 - Ilustração esquemática do procedimento para a pesquisa de AC, EB, EC, STA e BC através do método automatizado TEMPO®. **Fonte:** original da autora.

Tabela 6 - Temperatura e período de incubação de cada carta segundo o microorganismo em análise.

Microrganismo	Temperatura de incubação	Tempo de incubação
AC	30 °C	40-48h
EB	35 °C	22-24h
EC	37 °C	22-27h
STA	37 °C	24-27h
BC	30 °C	24-27h

AC- microrganismos aeróbios mesófilos; EB- *Enterobacteriaceae*; EC- *Escherichia coli*; STA- *Staphylococcus coagulase positiva*; BC- *Bacillus cereus*.

9.4. Metodologia realizada na pesquisa de *Salmonella* spp.

Na primeira fase para pesquisa de *Salmonella* spp. o meio de pré-enriquecimento *BPW* foi incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 16-22 horas. Posteriormente, foi feita a transferência de 0,1 mL para o caldo de enriquecimento seletivo *SX2*, que após homogeneização, foi a incubar durante 22-26 horas a $41,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Cumprido o tempo de incubação, o tubo foi novamente homogeneizado, e foi realizada a transferência de 500 µl para o orifício próprio da barrete, que de seguida foi introduzida no equipamento “*Heat and Go*” a $131\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos, seguidos de 10 minutos de arrefecimento, antes de ser colocada no equipamento *VIDAS*[®].

As amostras com resultado positivo são sujeitas a testes de confirmação e identificação segundo a norma ISO 6579-1:2017 (ISO 6579-1, 2017). Assim, recorre-se aos meios *XLD* e *IBISA Agar*[®], com auxílio de uma ansa descartável, retira-se uma alíquota do caldo *SX2*, e inocula-se nos meios de cultura seletivos, que vão a incubar durante 24 ± 3 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, passam-se colónias suspeitas (meio *XLD*: colónias pretas ou vermelhas com centro negro, *IBISA*: colónias de cor verde) para o meio *TSI* que incuba 18 a 24 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e culturas com aspeto característico (*TSI*: fundo amarelo; rampa vermelha ou inalterada; formação de sulfureto de hidrogénio $\pm$ fundo negro; formação de gás $\pm$) para o meio *TSA*, que vão a incubar durante 18-24 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente realiza-se identificação bioquímica no sistema *VITEK*[®] MS e identificação serológica, no Departamento de Doenças Infeciosas do INSA. A representação esquemática desta metodologia encontra-se presente na figura 13.

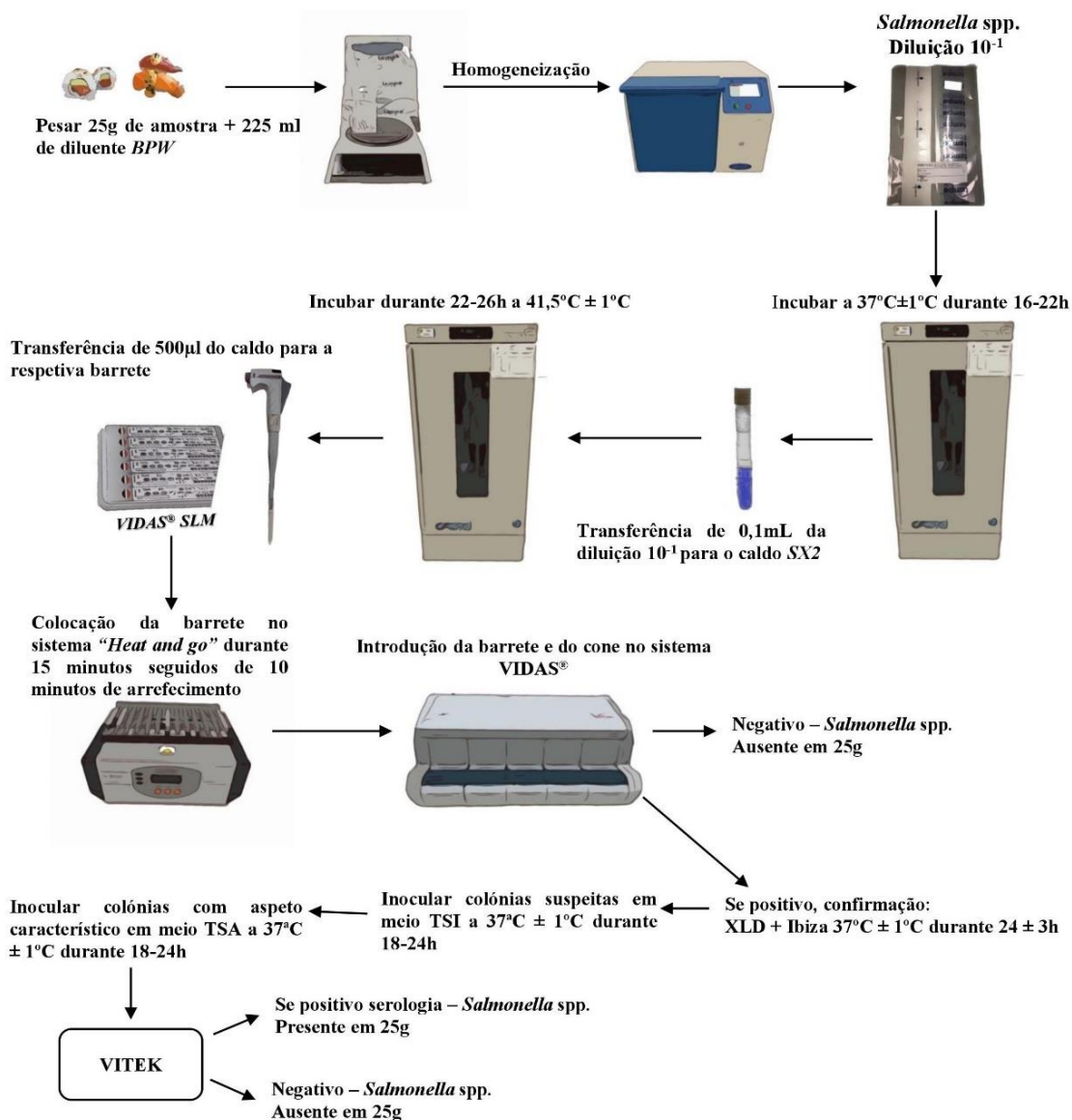


Figura 13 - Ilustração esquemática do procedimento para a pesquisa de *Salmonella* spp. através do método imunoenzimático VIDAS®. **Fonte:** original da autora.

9.5. Metodologia realizada na pesquisa de *Listeria monocytogenes*:

Para a pesquisa de *Listeria monocytogenes*, o caldo de pré-enriquecimento seletivo *Half-Fraser* foi a incubar durante 24-26 horas a 30 °C ± 1 °C. Posteriormente, transferiu-se 0,1 mL para o caldo de enriquecimento seletivo *Fraser*, que após homogeneização, foi a incubar 24 horas a 37 °C ± 1 °C. Após o tempo de incubação o tubo foi novamente homogeneizado, e foram transferidos 500 µl do caldo para o orifício próprio da barrete, que de seguida foi introduzida no sistema VIDAS®.

Em caso de resultados positivos, os testes são sujeitos a confirmação e identificação segundo a norma ISO 11290-1:2017 (ISO 11290-1, 2017). Com auxílio de uma ansa

descartável, retira-se uma alíquota, e inocula-se nos meios de cultura seletivos, ALOA e Oxford que vão a incubar durante 24-48 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, passam-se colónias suspeitas (colónias azuis com halo de precipitação, no caso de ALOA e colónias negras de centro côncavo no meio de Oxford), para o meio TSA que vão a incubar durante 18 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. A representação esquemática desta metodologia encontra-se presente abaixo na figura 14.

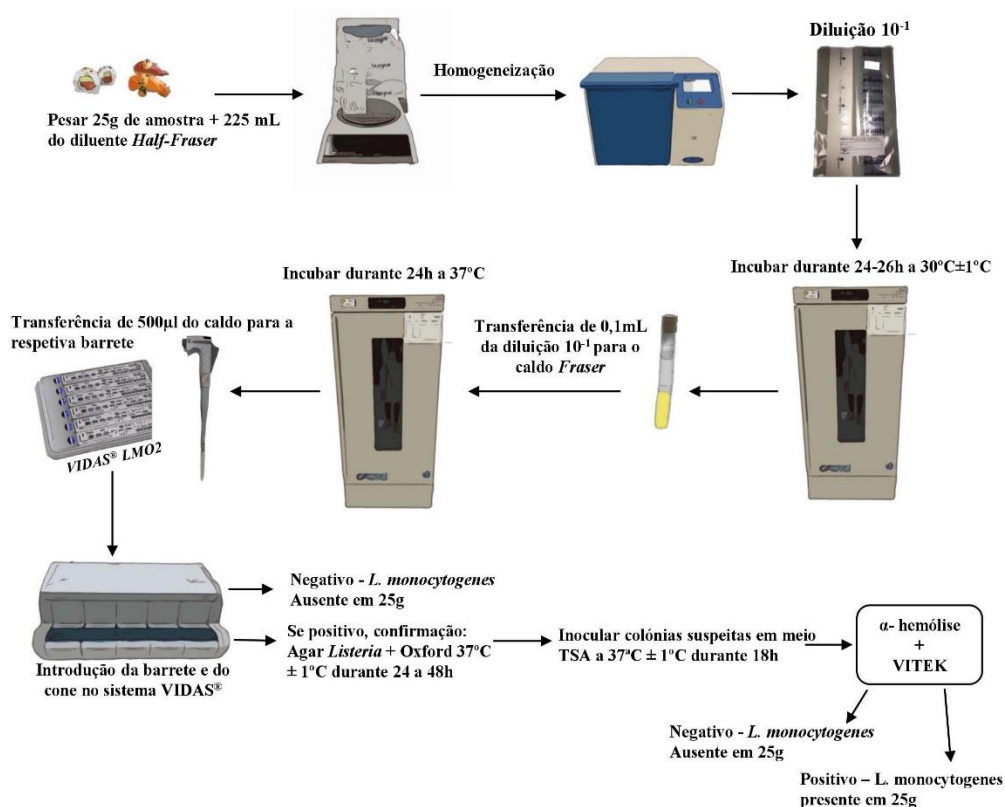


Figura 14- Ilustração esquemática do procedimento para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* através do método imunoenzimático VIDAS®. **Fonte:** original da autora.

9.6. Metodologia realizada na pesquisa de *Vibrio* spp.:

Na pesquisa de *Vibrio* spp. foi seguida a norma ISO 21872-1:2017. Numa primeira fase o meio de pré-enriquecimento APA foi a incubar durante 6 horas ± 1 hora a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Cumprido o tempo de incubação, foi realizada a transferência de 1 mL para dois tubos, cada um com 10 mL de APA. Ambos os tubos foram a incubar durante 18 horas ± 1 hora, mas a temperaturas distintas, a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, e a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. De seguida com o auxílio de ansas descartáveis, retirou-se de ambos os tubos, duas alíquotas. Das duas alíquotas de cada tubo, uma foi inoculada no meio TCBS, e outra no meio VCA. As placas foram a incubar durante

24 horas $\pm$ 3 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (ISO 21872-1, 2017). A representação esquemática desta metodologia encontra-se presente abaixo na figura 15.

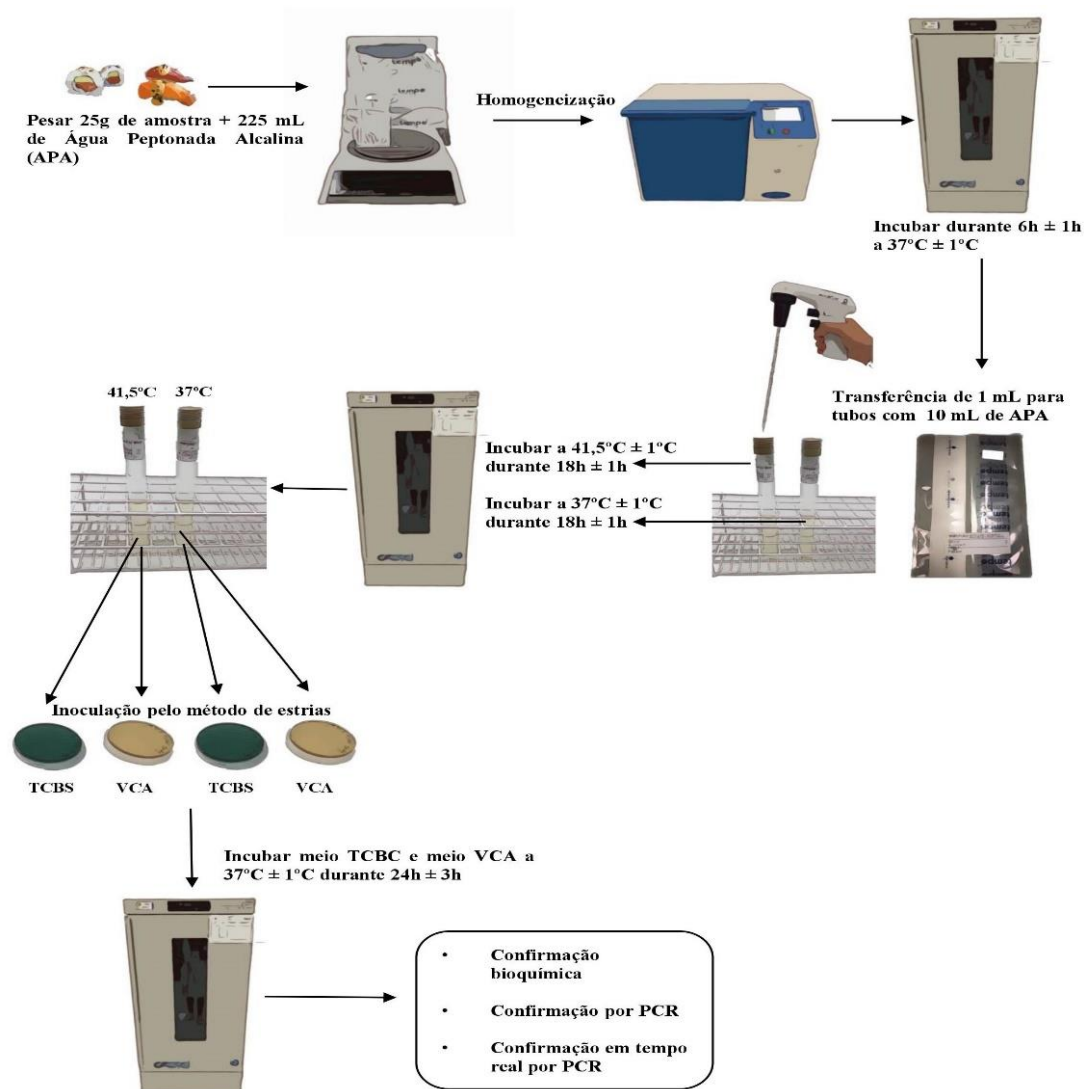


Figura 15 - Ilustração esquemática do procedimento para a pesquisa de *Vibrio* spp. **Fonte:** original da autora.

Após o tempo de incubação, foi realizada a interpretação dos resultados, com base na morfologia das colónias cuja interpretação no meio TCBS se encontra na tabela 7 e no meio VCA na tabela 8. As colónias com morfologia suspeita de espécies de *Vibrio*, foram sujeitas ao teste da oxidase, quando oxidase positivas, foi realizada a confirmação no equipamento VITEK[®] MS.

Tabela 7 - Interpretação dos resultados no meio TCBS com base na morfologia das colônias

Microrganismo	Coloração e morfologia das colônias
<i>V. parahaemolyticus</i>	Azuis a verdes, 3-5 mm de diâmetro
<i>V. cholerae</i>	Amarelas, planas, 2-3 mm de diâmetro
<i>V. vulnificus</i>	Azuis a verdes, 2-3 mm de diâmetro
<i>V. alginolyticus</i>	Amarelas, 3-5 mm de diâmetro

Fonte: www.oxid.com

Tabela 8 - Interpretação dos resultados no meio VCA com base na morfologia das colônias

Microrganismo	Coloração das colônias
<i>V. parahaemolyticus</i>	Rosa – vermelho
<i>V. cholerae</i>	Azuis - azuis turquesa
<i>V. vulnificus</i>	Azuis - azuis turquesa
<i>V. alginolyticus</i>	Branças - creme

Fonte: www.chromagar.com

9.7. Metodologia para classificação das amostras segundo os critérios microbiológicos:

A qualidade microbiológica das amostras foi interpretada tendo como base os Valores-guia INSA de setembro de 2019, apresentados nas tabelas 9 e 10. Sendo os Valores-guia para *sushi*, especificados no subgrupo 2D, que inclui queijos (fabricados com leite cru), carne, peixes, mariscos (crus, marinados, fumados ou salgados), acompanhados ou não de alimentos totalmente cozinhados, frutos, hortícolas e algas crus (INSA, 2019).

A interpretação dos resultados obtidos, depende do número de unidades formadoras de colônias presentes por grama ou mililitro na amostra analisada, da detecção ou não de microrganismos patogênicos, e das suas toxinas. De acordo com a sua qualidade microbiológica, os produtos prontos para consumo classificam-se em:

- **Satisfatório** – o resultado analítico encontra-se dentro dos valores previstos, ou seja, inferior ou igual ao Valor Máximo de Referência (VMR).
- **Questionável** – o resultado analítico é superior ao VMR e inferior ou igual ao Valor Máximo Admissível (VMA) e indica que existe probabilidade de falhas nos processos. Deve ser efetuada uma análise de causas, de forma a esclarecer a causa provável.
- **Não satisfatório e Não satisfatório/potencialmente perigoso** – o resultado analítico é superior ao VMA e indica que existem falhas nos processos. Deve ser

efetuada uma análise de causas, de forma a esclarecer a causa provável (INSA, 2019).

Tabela 9 – “Valores-guia INSA” - microrganismos indicadores de higiene e alteração em alimentos prontos para consumo. Resultados interpretados segundo a contagem de ufc/g.

Microrganismos indicadores de higiene e alteração	Satisfatório	Questionável	Não satisfatório
Microrganismos a 30 °C	$< 10^6$	$10^6 - \leq 10^7$	$> 10^7$
<i>Enterobacteriaceae</i>	$< 10^4$	$10^4 - \leq 10^5$	$> 10^5$
<i>Escherichia coli</i>	< 10 (Não detetado)	$10 - \leq 10^2$	$> 10^2$

Fonte: (INSA, 2019).

Tabela 10 – “Valores-guia INSA” - microrganismos patogénicos e toxinas em alimentos prontos para consumo. Resultados interpretados segundo a contagem de ufc/g ou a pesquisa em 25 g de amostra.

Microrganismos patogénicos e toxinas	Satisfatório	Não satisfatório	Não satisfatório/potencialmente perigoso
Estafilococos coagulase positiva	$< 10^2$	$10^2 - \leq 10^4$	$> 10^4$
<i>Bacillus cereus</i>	$< 10^3$	$10^3 - \leq 10^5$	$> 10^5$
<i>Salmonella</i> spp.	Não detetado	Não aplicável	Detetado
<i>Listeria monocytogenes</i>	Não detetado	Detetado	$> 10^2$
<i>Vibrio</i> spp.	Não detetado	Não aplicável	Detetado

Fonte: (INSA, 2019).

9.8. Metodologia utilizada na análise dos resultados obtidos

A análise dos dados foi realizada através de estatística descritiva e inferencial, utilizando-se o software SPSS-24.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*).

A discussão dos resultados obtidos neste estudo, incide na comparação de resultados obtidos e publicados noutros estudos, sendo apenas indicativa, visto que existem diferenças relativamente às condições de ensaio, variedades analisadas, número de amostras e superfícies comerciais onde foram recolhidas as amostras.

10. Apresentação e discussão dos resultados

10.1. Resultados obtidos nas análises microbiológicas por parâmetro microbiológico analisado

A tabela 11 mostra as médias de contagem, desvio padrão e os valores mínimos e máximos obtidos, para cada parâmetro microbiológico analisado, no total de amostras e em cada superfície comercial.

A média do total de amostras analisadas relativamente a AC foi 6,67 log ufc/g e os valores variaram entre 4,57 e 8,69 log ufc/g. Relativamente às médias de AC, e valores mínimos e máximos, por superfície comercial foram de 6,62 log ufc/g (4,83 – 8,08) no hipermercado e de 6,73 log ufc/g (4,57 – 8,69) no restaurante. Enquanto que, a média global de EB foi 4,16 log ufc/g e os valores variaram entre 1,00 e 6,83 log ufc/g [4,50 log ufc/g (2,72 – 6,83) e 3,81 log ufc/g (1,00 – 6,23) em hipermercado e restaurante, respetivamente]. Em STA a média global foi 1,44 log ufc/g e os valores variaram entre 1,00 e 2,18 [com 1,59 log ufc/g (1,00 - 2,18) e 1,42 log ufc/g (1,00 - 2,11) em hipermercado e restaurante respetivamente]. No que se refere a BC, a média global foi 1,74 variando entre 1,00 e 3,43 [com 1,91 log ufc/g (1,00 - 3,43) em hipermercado e 1,60 log ufc/g (1,00 - 2,72) em restaurante] (tabela 11).

Relativamente à contagem de EC, apenas foi detetada a sua presença em uma amostra com valor de 1,00 log ufc/g. Na pesquisa de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Vibrio* spp. todas as amostras foram consideradas com nível microbiológico Satisfatório para estes parâmetros, não tendo sido detetada a presença desses microrganismos em 25 g de amostra, de acordo com os valores-guia INSA 2019 (tabela 9 e 10).

Tabela 11 – Médias de contagem expressos em log ufc/g, desvio padrão, e valores mínimos e máximos obtidos, por parâmetro microbiológico analisado, no total de amostras e por superfície comercial.

	TOTAL					Hipermercado					Restaurante				
	n	Média	Dp	Min	Máx	n	Média	Dp	Min	Máx	n	Média	Dp	Min	Máx
log AC	62	6,67	1,06	4,57	8,69	31	6,62	1,02	4,83	8,08	31	6,73	1,12	4,57	8,69
log EB	62	4,16	1,22	1,00	6,83	31	4,50	1,09	2,72	6,83	31	3,81	1,26	1,00	6,23
log STA	15	1,44	0,44	1,00	2,18	2	1,59	0,83	1,00	2,18	13	1,42	0,41	1,00	2,11
log BC	26	1,74	0,72	1,00	3,43	12	1,91	0,79	1,00	3,43	14	1,60	0,66	1,00	2,72

AC- microrganismos aeróbios mesófilos; EB- *Enterobacteriaceae*; STA- *Estafilococos* coagulase positiva; BC- *Bacillus cereus*; n- número de amostras; Dp- desvio padrão; Min- mínimo; Máx- máximo.

10.2. Avaliação da qualidade microbiológica por parâmetro microbiológico analisado

10.2.1. Microrganismos aeróbios mesófilos

O gráfico 1 representa a distribuição das amostras de *sushi*, por superfície comercial, quanto à qualidade microbiológica, relativamente à contagem de microrganismos a 30 °C. Relativamente à contagem de AC, 40,3% (25/62) das amostras foram classificadas com um nível microbiológico Não Satisfatório, das quais, 22,6% (14/62) eram provenientes do hipermercado e 17,7% (11/62) do restaurante. Como Questionável foram consideradas 32,3% (20/62) das amostras [11,3% (7/62) em hipermercado e 21% (13/62) em restaurante] e apenas 27,4% (17/62) foram consideradas com nível microbiológico Satisfatório, das quais, 16,1% (10/62) e 11,3% (7/62) em hipermercado e restaurante, respetivamente (gráfico 1).

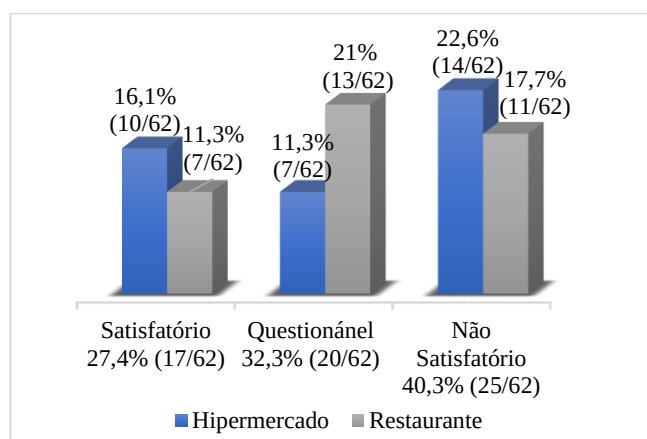


Gráfico 1- Distribuição das amostras de *sushi* quanto ao nível de qualidade microbiológica, relativamente à contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, por superfície comercial.

Leisner *et al.* (2014), efetuaram um estudo em 2012 na Dinamarca, a 20 estabelecimentos de *sushi*, tendo encontrado valores de microrganismos aeróbios mesófilos entre 4,1 e 7,5 log ufc/g, mas a percentagem de amostras com resultado $> 10^6$ foi inferior ao do presente trabalho. Posteriormente, Li, Stegger, Dalsgaard & Leisner (2019) em outro estudo realizado no mesmo país em 2017, encontraram contagens de microrganismos aeróbios mesófilos que se situaram entre 4,8 e 5,5 log, valores mais satisfatórios comparativamente com os do nosso estudo como se pode observar na tabela 11.

Hoel, Mehli, Bruheim, Valdstein & Jakobsen (2015) avaliaram a qualidade microbiológica de amostras de *sushi*, com 2-3 dias de vida útil, provenientes de hipermercados na Noruega. As amostras eram provenientes de três produtores diferentes, codificados no estudo

como produtor A, B e C. Relativamente às amostras do hipermercado, no nosso estudo a média global de contagem foi 6,62 log ufc/g (de 4,83-8,08), média muito semelhante à encontrada por estes autores a qual foi de 6,1 ufc/g (de 5,1-7,3) no produtor A, 6,6 ufc/g (de 5,8-7,4) no produtor C e ligeiramente inferior, 5,8 ufc/g (4,4-7,2) no produtor B. No mesmo estudo, foram recolhidas amostras diretamente das instalações de produção de um dos produtores, antes da expedição dos produtos para os hipermercados, os resultados revelaram uma diminuição significativa ($p < 0,01$) nas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos, comparativamente com as amostras recolhidas nos hipermercados. Os autores sugerem, com base nos resultados, que existiu um controlo inadequado da temperatura durante a distribuição, o que levou a uma diminuição da qualidade microbiológica das amostras. Referem ainda que 91% das amostras, foram analisadas pelo menos um dia antes, do último dia de vida útil, indicado no rótulo do produto, sugerindo que a contagem provavelmente seria ainda mais elevada, caso as amostras fossem analisadas no último dia de vida útil indicado (Hoel *et al.*, 2015).

No presente estudo, as amostras foram preparadas pelos estabelecimentos na hora da recolha, transportadas a temperatura controlada, e as análises microbiológicas realizadas no prazo máximo de 20 horas após a recolha. Os resultados obtidos por Hoel *et al.* (2015) sugerem que provavelmente a percentagem de amostras com nível microbiológico Não Satisfatório seria mais elevada, caso as amostras fossem transportadas sem controlo de temperatura, e/ou analisadas após um período mais longo após a sua recolha, condições idênticas quando o produto é adquirido pelo consumidor final, em que o transporte é feito sem controlo de temperatura até o produto ser consumido ou novamente refrigerado.

Liang *et al.* (2016) analisaram 120 amostras de *sushi* provenientes de restaurantes em Hong Kong, também na modalidade de *take-away*, tendo obtido, como média global de contagem 5,5 log ufc/g, e os valores variaram entre 2,4 - 6,8 log ufc/g, enquanto no nosso estudo, os valores obtidos nas amostras provenientes do restaurante foram comparativamente mais elevados (tabela 11).

O nível de contaminação microbiológico do produto final é influenciado pela qualidade microbiológica das matérias-primas, pelo cumprimento de práticas rigorosas de higiene pessoais, dos equipamentos, utensílios, e pelo armazenamento das matérias-primas a temperaturas adequadas sendo que, contagens elevadas de microrganismos aeróbios mesófilos, podem indicar falhas durante o processo (FEHD, 2000; HPA, 2009). Contagens com valores $> 10^6$ ufc/g estão normalmente associados a uma flora mista, acima desse valor, geralmente existe um microrganismo predominante, logo, a segurança e qualidade organolética do produto,

são dependentes do microrganismo em questão. Para produtos alimentares crus, prontos para consumo, como legumes e salada (frequentemente utilizados na preparação de *sushi*), são esperados valores entre os 10^6 - 10^8 ufc/g, e em peixe cru valores entre 10^6 - 10^7 ufc/g (HPA, 2009) e por consequência, os nossos resultados encontram-se dentro do esperado.

É importante identificar os microrganismos predominantes em contagens elevadas, de modo a detetar as possíveis falhas existentes que podem ter dado origem a esses valores, e em que fase do processo ocorreram (HPA, 2009).

Os resultados obtidos no presente estudo, revelam falhas em alguma fase do processo, a baixa percentagem de amostras com qualidade microbiológica satisfatória pode estar associada a matérias-primas de baixa qualidade, falhas de temperatura durante o transporte, armazenamento a temperaturas inadequadas e práticas de higiene e manipulação incorretas.

10.2.2. *Enterobacteriaceae*

O gráfico 2 corresponde à classificação e distribuição das amostras, de acordo com os resultados obtidos nas análises microbiológicas, referentes à contagem microbiológica de *Enterobacteriaceae* por superfície comercial.

Na contagem de *Enterobacteriaceae* 17,7% (11/62) das amostras foram classificadas com nível microbiológico Não Satisfatório, das quais 9,7% (6/62) foram provenientes do hipermercado e 8% (5/62) do restaurante. Foram consideradas com nível microbiológico Questionável 42% (26/62) das amostras [27,4% (17/62) e 14,6% (9/62) em hipermercado e restaurante, respetivamente], e com nível microbiológico Satisfatório 40,3% (25/62) das amostras, das quais, 12,9% (8/62) em hipermercado e 27,4% (17/62) em restaurante.

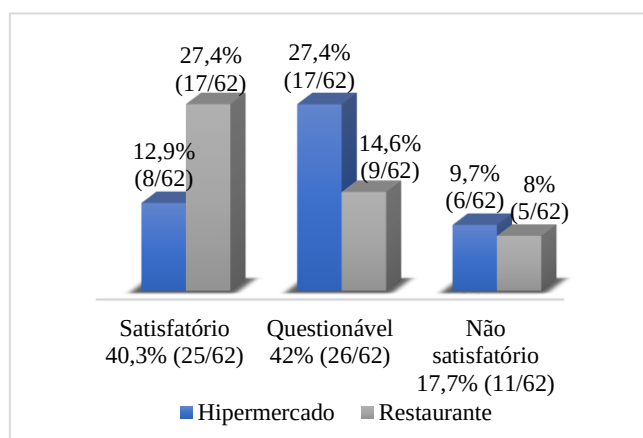


Gráfico 2- Distribuição das amostras de *sushi* quanto ao nível de qualidade microbiológica, relativamente à contagem de *Enterobacteriaceae*, por superfície comercial.

Miguéis *et al.* (2014) analisaram 61 amostras de *sashimi* provenientes de 23 restaurantes no Norte de Portugal, obtiveram uma média global de 3,27 log ufc/g, muito semelhante à média encontrada no presente estudo de 3,81 ufc/g em restaurante (tabela 11). Hoel *et al.* (2015) detetaram *Enterobacteriaceae* em todas as 58 amostras que analisaram, com média de 3,3 log ufc/g, no presente estudo também foi detetada em todas as amostras analisadas, no entanto, a média global foi superior [4,16 log ufc/g (tabela 11)]. Os mesmos autores, ao realizarem ensaios microbiológicos aos ingredientes em separado, detetaram a presença de *Enterobacteriaceae* em salmão, alabote, *wakame* (alga) e cebolinha, com um intervalo compreendido entre 1,3 - 2,9 log ufc/g e, de acordo com os resultados, afirmam que bactérias pertencentes à família das *Enterobacteriaceae* podem ser introduzidas através de vegetais e peixe cru.

Num estudo realizado por Tirloni, Bernardi, Gandolfi, Cattaneo & Stella (2017) foram colhidas 36 amostras de *sushi*, diretamente de uma fábrica de produção em Itália, com o objetivo de simular um abuso térmico, como provavelmente ocorre no verão, as amostras foram armazenadas a 12 °C durante 2 horas simulando o transporte, e posteriormente foram armazenadas a 8 °C durante 4 dias, simulando o armazenamento doméstico, sendo os ensaios microbiológicos realizados todos os dias. A contagem inicial de *Enterobacteriaceae* foi 3,18 log ufc/g, e após os 4 dias de armazenamento foi de 4,87 log ufc/g, os autores referem que o aumento observado foi gradual, e que a contagem de 4,0 log ufc/g foi ultrapassada após dois dias de armazenamento. Referem ainda que a contaminação inicial encontrada pode dever-se à presença de microrganismos em vegetais e contaminação por parte de manipuladores, refletindo práticas de higiene e de fabrico inadequadas.

Moura (2015) ao analisar 60 refeições de *sashimi* provenientes de restaurantes no Norte de Portugal, obteve como média global de contagem de *Enterobacteriaceae* 3,42 log ufc/g, [em estabelecimentos especializados (2,51 log ufc/g) e em estabelecimentos não especializados (4,54 log ufc/g)]. Comparativamente, no nosso estudo, a média global (4,16 log ufc/g) e a média relativa a estabelecimentos especializados [restaurante, 3,81 log ufc/g (tabela 11)], foi um pouco mais elevada. No entanto, os nossos resultados foram idênticos aos de Moura (2015) relativamente às contagens de *Enterobacteriaceae* em estabelecimentos não especializados [hipermercado, 4,50 log ufc/g (tabela 11)].

É de referir que a maioria dos produtos usados na preparação das amostras avaliadas apresenta naturalmente microrganismos, nomeadamente *Enterobacteriaceae*, visto que muitos dos seus géneros fazem parte da microbiota de vegetais e peixes crus, sendo expectável que

apresentem contagens elevadas. No entanto, a contagem de *Enterobacteriaceae* é utilizada para avaliar o estado de higiene geral de um produto alimentar, a sua presença em alimentos pode ser sugestiva de contaminação ambiental e más práticas de higiene, como por exemplo, incorreta higienização de produtos hortofrutícolas (Hoel *et al.*, 2015). Na produção alimentar, as *Enterobacteriaceae* são inativadas através dos processos térmicos utilizados (HPA, 2009), no *sushi* devido à inexistência de processos térmicos destinados à eliminação de microrganismos, o mesmo não acontece, sendo de extrema importância matérias-primas de alta qualidade e medidas rigorosas de higiene e de fabrico em todas as etapas.

10.2.3. *Escherichia coli*

A presença de *E. coli* foi detetada em apenas uma amostra, proveniente do restaurante, esta foi classificada com um nível microbiológico Questionável, com valor de 1,00 log ufc/g segundo os valores-guia INSA 2019 (tabela 9).

Resultados diferentes obtiveram Santos *et al.* (2012) que realizaram a contagem para coliformes termotolerantes a 45 °C e em que, 80% (28/35) das amostras de *sushi* analisadas, apresentaram valores $> 10^2$ ufc/g e foi identificada *E. coli* nessas amostras. Posteriormente, Liang *et al.* (2016), obtiveram como média global 1,0 log ufc/g em 120 amostras que analisaram.

Leisner *et al.* (2014) relativamente às contagens de *E. coli*, encontraram valores superiores aos deste trabalho, com valores que variaram entre 1,4 e 2,3 log ufc/g.

Por outro lado, Atanassova, Reich & Klein (2008) analisaram 250 amostras provenientes de supermercados e bares de *sushi* na Alemanha, e estabeleceram a comparação entre *sushi* fresco preparado na hora e congelado. Em relação ao *sushi* congelado, *E. coli* foi isolada em 6/125 amostras, com contagens entre 2,0 - 3,1 log ufc/g, enquanto, no *sushi* preparado na hora, *E. coli* foi isolada em 24/125 amostras com contagens de 2,0 - 3,3 log ufc/g.

No estudo de Martins (2006), foram analisadas 20 amostras de *sushi* e *sashimi*, provenientes de estabelecimentos especializados, e não especializados, em cozinha japonesa, *E. coli* foi isolada em 4 das 8 amostras provenientes de estabelecimentos especializados, e em 5 das 12 amostras de estabelecimentos não especializados, resultados menos satisfatórios comparativamente aos do nosso estudo, em que apenas foi detetada em uma amostra proveniente do restaurante.

Em termos segurança alimentar, *E. coli*, é o indicador mais comumente utilizado para avaliar o estado de higiene de um produto, reflete uma contaminação fecal, e a possível

presença de microrganismos patogénicos em alimentos. A presença de *E. coli* em *sushi*, pode dever-se a matérias-primas contaminadas e mal higienizadas, como frutos e vegetais, más práticas de higiene pessoais, durante a manipulação e temperaturas de armazenamento inadequadas (FEHD, 2000; Beuchat, 2006; HPA, 2009). O Regulamento (CE) nº 2073/2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, estabeleceu limites para produtos da pesca, descascados e sem concha à base de crustáceos e moluscos cozidos, cujo intervalo de *E. coli* é compreendido entre 1 ufc/g e 10 ufc/g, em que apenas 2/5 amostras podem apresentar valores dentro deste intervalo estabelecido. O critério aplica-se no fim do processo de fabrico, em caso de resultados não satisfatórios, as medidas são a melhoria da higiene na produção (Regulamento (CE) nº 2073/2005).

10.2.4. Estafilococos coagulase positiva

O gráfico 3 representa a distribuição das amostras de *sushi*, por superfície comercial, quanto à qualidade microbiológica, relativamente à contagem de Estafilococos coagulase positiva. Foram classificadas com um nível microbiológico Não Satisfatório, 6,4% (4/62) das amostras, das quais, 1,6% (1/62) eram provenientes do hipermercado e 4,8% (3/62) do restaurante. Com nível microbiológico Satisfatório foram consideradas 93,6% (58/62) das amostras [48,4% (30/62) em hipermercado e 45,2% (28/62) em restaurante].

Nenhuma amostra foi classificada com nível microbiológico Não Satisfatório/potencialmente perigoso [$> 10^4$ (tabela 10)].

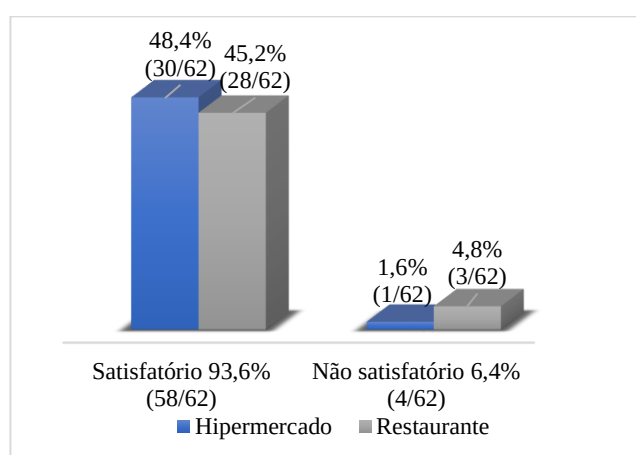


Gráfico 3- Distribuição das amostras de *sushi* quanto ao nível de qualidade microbiológica, relativamente à contagem de Estafilococos coagulase positiva, por superfície comercial.

Liang *et al.* (2016) obtiveram como média global na contagem de *Staphylococcus aureus* 2,3 log ufc/g, no presente estudo, a média global de Estafilococos coagulase positiva das amostras analisadas foi menor, com 1,44 log ufc/g (tabela 11).

No estudo realizado por Leisner *et al.* (2014) os valores de *Staphylococcus* spp., variaram entre 2,5 e 3,0 log ufc/g, no nosso estudo os valores variaram entre 1,00 e 2,18 log ufc/g, também Li *et al.* (2019) obtiveram valores de contagem superiores aos do presente estudo, com contagens entre 3,3 e 3,8 log ufc/g.

Num outro estudo, realizado por Hoel *et al.* (2015) foram analisados os ingredientes destinados à preparação de *sushi* antes do seu processamento em fábrica, não tendo sido detetada a presença de *S. aureus* em nenhuma das matérias-primas analisadas. De igual modo, Basti *et al.* (2006) ao analisarem pescado recém-capturado, também não isolaram *S. aureus*, indicando que este microrganismo não faz parte da microbiota destes produtos.

Como referido anteriormente, *Staphylococcus* spp. faz parte da microbiota normal do homem, aproximadamente 30% dos indivíduos saudáveis são portadores assintomáticos de estafilococos enterotoxigénicos, assim sendo, a contaminação dos alimentos pode ocorrer por contaminação cruzada, quando as práticas de higiene e de fabrico são deficientes (Kim, Yun & Rhee, 2011). O Regulamento (CE) nº 2073/2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, estabeleceu limites para produtos da pesca, descascados e sem concha à base de crustáceos e moluscos cozidos, cujo intervalo de Estafilococos coagulase positiva é compreendido entre 100 ufc/g e 1000 ufc/g, em que apenas 2/5 amostras podem apresentar valores dentro deste intervalo estabelecido. O critério aplica-se no fim do processo de fabrico, em caso de não conformidade, as medidas são a melhoria da higiene na produção (Regulamento (CE) nº 2073/2005).

10.2.5. *Bacillus cereus*

A média de contagem global foi 1,74 log ufc/g com valores a variarem entre 1,00 e 3,43 log ufc/g (tabela 11). A presença de *Bacillus cereus* foi detetada em 26 amostras, das quais 25 foram classificadas com nível microbiológico Satisfatório com valores < 3 log ufc/g segundo os valores-guia INSA 2019 (tabela 10), apenas uma amostra proveniente de hipermercado foi classificada com nível microbiológico Não Satisfatório, com valor de 3,43 log ufc/g para este parâmetro.

No estudo realizado por Eglezos, Huang, Dykes & Fegan (2010), analisaram 1263 amostras de diversos produtos alimentares e, *Bacillus cereus*, não foi detetado em nenhuma das

70 amostras de *sushi* analisadas. Embora tenha sido isolada noutros alimentos como: base de pizzas crua, pizzas cozinhadas, empadas de carne congeladas, salsichas congeladas, carnes processadas e frango cortado em cubos.

Muscolino *et al.* (2014) analisaram 38 amostras de *sushi* e 12 de *sashimi*, comercializadas no sul de Itália, tendo detetado a presença de *Bacillus cereus* em 3/38 das amostras de *sushi* analisadas, com valores compreendidos entre 1,70 - 4,00 log ufc/g.

De um modo geral, a presença de *Bacillus cereus* não é muito frequente em *sushi*, outros estudos obtiveram resultados similares. Martins (2006) detetou a presença de *Bacillus cereus* em 1/8 amostras adquiridas em estabelecimento especializado e em 2/12 amostras adquiridas em estabelecimentos não especializados com valores < 3 log ufc/g. Enquanto, Tirloni *et al.* (2017), não observaram crescimento de *Bacillus cereus* na maioria das amostras analisadas, tendo sido detetado em apenas uma amostra com valor de 2,0 log ufc/g.

Por norma, a presença de *Bacillus cereus* em alimentos indica processamento inadequado, e falhas no controlo de temperatura. O controlo inadequado da temperatura, pode permitir a sobrevivência de esporos e o crescimento a níveis não satisfatórios (HPA, 2009). No *sushi* a presença de *Bacillus cereus* reflete uma incorreta acidificação do arroz, ou contaminação cruzada por outros alimentos como vegetais e peixe (Lee & Heacock, 2014).

10.2.6. Correlação entre os microrganismos em estudo

Com o objetivo de verificar se existe alguma relação entre as contagens de microrganismos presentes nas amostras de *sushi* analisadas, e dado que a amostra neste caso apresentou uma distribuição normal, segundo o teste da normalidade de Kolmogorov Smirnov cujo p-value foi ($p > 0,05$), foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson, que mede a intensidade e a direção da associação de tipo linear entre duas variáveis quantitativas (Marôco, 2014).

A tabela 12 é referente à correlação entre os microrganismos AC, EB, BC e STA. As análises estatísticas indicam que existe uma correlação positiva moderada entre os microrganismos AC e EB ($r=0,477^{**}$), o que significa que há uma tendência para que quando os valores de AC sobem, sobem também os valores de EB.

Tabela 12- Correlação entre os microrganismos

	log AC	log EB	log BC
log EB	,477**		
log BC	-0,064	-0,341	
log STA	-0,274	0,064	-0,350

** . A correlação é significativa no nível 0,01 (bilateral).

10.2.7. *Salmonella* spp.

A presença do género *Salmonella* não se verificou em nenhuma das 62 amostras analisadas, todas as amostras encontravam-se com um nível microbiológico Satisfatório para este parâmetro, de acordo com os Valores-guia do INSA (tabela 10), sendo que a sua presença detetada em 25 g de amostra é considerada Não satisfatório/potencialmente perigoso (Regulamento (CE) nº 2073/2005; INSA, 2019).

O resultado obtido no nosso estudo, é idêntico ao de outros autores que durante as suas pesquisas em *sushi* ou *sashimi* não detetaram a presença deste microrganismo, (Martins, 2006; Mendes, 2010; Vallandro *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012; Sato, 2013; Miguéis *et al.*, 2014; Moura, 2015; Liang *et al.*, 2016; Eliseu, 2018).

Resultados diferentes foram obtidos no estudo de Atanassova *et al.* (2008) que detetaram *Salmonella* em 3 amostras de *sushi* congelado, e em 1 amostra de *sushi* fresco preparado na hora. De igual modo, em amostras de *sushi* e *sashimi* provenientes de 5 estabelecimentos diferentes em Fortaleza, no Brasil, foram detetadas *Salmonella* spp. e *Salmonella* Newport em 4/30 amostras analisadas (Pinheiro *et al.*, 2006). Enquanto, no estudo realizado em Hong Kong, entre 1997-1999, a 1020 amostras de *sushi* e 906 amostras de *sashimi*, *Salmonella* spp. foi isolada em apenas uma amostra de *sashimi* (FEHD, 2000).

Salmonella spp. pode ser encontrada no trato intestinal de humanos e animais, e alimentos que tenham contacto com material de origem fecal são facilmente contaminados. Esta bactéria multiplica-se rapidamente em alimentos de origem animal devido às características inerentes destes produtos. A dose infetante pode variar de 10 a milhões de células. A prevenção da presença deste microrganismo em alimentos, consiste sobretudo no tratamento térmico dos alimentos a temperaturas entre os 64 e 74 °C, armazenamento dos alimentos a temperaturas ≤ 5 °C e a aplicação de boas práticas de higiene e de fabrico (Amson, Haracemiv & Masson, 2006).

No caso do *sushi*, uma vez que é servido sem tratamento térmico, o cumprimento de rigorosas práticas de higiene, manipulação e controlo de temperatura durante todo o processo,

são pontos cruciais para evitar a contaminação e multiplicação deste microrganismo (Amson *et al.*, 2006; HPA, 2009).

10.2.8. *Listeria monocytogenes*

Não se verificou a presença de *Listeria monocytogenes* em nenhuma das 62 amostras analisadas, sendo que todas as amostras se encontravam dentro dos valores exigidos para este parâmetro, de acordo com os Valores-guia do INSA (tabela 10), a sua presença detetada em níveis $> 10^2$ ufc/g é considerada Não satisfatório/potencialmente perigoso (Regulamento (CE) nº 2073/2005; INSA, 2019).

Resultado idêntico foi obtido por Muscolino *et al.* (2014) ou por Eliseu (2018), este após analisar 39 amostras de *sushi*, de 3 variedades diferentes, em 3 condições distintas (embaladas em atmosfera protetora, *sushi* congelado e *sushi* proveniente de restaurante) não detetou a presença de *Listeria monocytogenes* em nenhuma amostra que analisou. De igual modo, Tirloni *et al.* (2017), também não detetaram a presença de *Listeria monocytogenes*.

Por outro lado, Mendes (2010), apesar de não isolar *Listeria monocytogenes* em 90 amostras de *sushi*, detetou a presença de *Listeria seeligeri* em uma das amostras, no entanto no nosso estudo não seria possível, uma vez que a pesquisa foi dirigida unicamente a *Listeria monocytogenes*. Num outro estudo, *Listeria* spp foi detetada em 3 das amostras de *sushi* congelado, identificada como *Listeria welshimeri*, e em *sushi* preparado na hora, *Listeria* spp. foi detetada em 4 amostras, 3 das quais foram identificadas como *Listeria monocytogenes* (Atanassova *et al.*, 2008). Num estudo realizado em Hong Kong, das 906 amostras de *sashimi* analisadas, *Listeria monocytogenes* foi isolada em apenas uma amostra de *sashimi* (FEHD, 2000). Enquanto, no estudo de Moura (2015), foi detetada a presença de *Listeria monocytogenes* em amostras de estabelecimentos não típicos com média de 0,41 log ufc/g e, 93,3% das amostras encontravam-se em níveis Satisfatórios, e em 6,7% das refeições de *sashimi* encontravam-se em níveis Não satisfatórios/potencialmente perigosos.

Listeria monocytogenes é normalmente encontrada em produtos lácteos, vegetais, aves e carne. No *sushi*, pode ser introduzida através de contaminação cruzada, por outros ingredientes, como vegetais, peixe e marisco. É crucial a aplicação de práticas de higiene e de fabrico adequadas, a fim de evitar a contaminação dos alimentos por este microrganismo. O grupo de risco (crianças, idosos, gestantes, imunodeprimidos) devem ter especial atenção com o consumo de *sushi*, por serem mais suscetíveis ao desenvolvimento dos sintomas (FEHD, 2000).

10.2.9. *Vibrio* spp.

No nosso estudo, não foram isoladas espécies de *Vibrio* spp. em nenhuma das 62 amostras analisadas, sendo que todas as amostras se encontravam com nível microbiológico Satisfatório para este parâmetro de acordo com os Valores-guia do INSA (tabela 10), sendo que a sua presença detetada em 25 g de amostra é considerada Não satisfatório/potencialmente perigoso (INSA, 2019).

Tal como ocorreu neste estudo, Vallandro *et al.* (2011), após analisarem 108 amostras de *sashimi* de salmão, recolhidas em 6 restaurantes na cidade de Porto Alegre, Brasil, não isolaram *V. parahaemolyticus*.

Resultados diferentes obteve Martins (2006), que após analisar 20 amostras detetou a presença de espécies de *Vibrio* em 35% (7/20) das amostras, sendo que 3 das 7 amostras positivas apresentavam contaminação por mais do que uma espécie, e haviam sido colhidas em estabelecimentos não especializados. No mesmo estudo, em estabelecimentos especializados, foi detetada a presença de *Vibrio* em 37,5% (3/8) amostras, e em não especializados em 33,3% (4/12), as espécies isoladas foram: *V. metschnikovii*, *V. fluvialis*, *V. anguillarum*, *V. iliopiscarius* e *V. ordalli*. Enquanto, Muscolino *et al.* (2014), detetaram a presença de *Vibrio* spp. em 39,5% (15/38) amostras de *sushi*, com valores compreendidos entre 1,70 - 3,70 log ufc/g, e em 50% (6/12) amostras de *sashimi*, com valor médio de 2,00 log ufc/g.

Em Portugal, no estudo de Miguéis *et al.* (2014), foram isoladas 4 espécies de *Vibrio*: *V. pelagius* I em atum e peixe-manteiga, *V. proteolyticus* em salmão, *V. mimicus* em robalo europeu e *V. corarillilyticus* em peixe-manteiga. Por outro lado, Moura, (2015) detetou a presença de *Vibrio* spp. em 6 amostras de *sashimi* provenientes de estabelecimentos típicos (2 de salmão, 2 de atum, 2 de robalo) e em uma amostra de robalo proveniente de um estabelecimento não típico.

Basti *et al.* (2006), isolaram *V. parahaemolyticus* em pescado recém-capturado, indicando que este microrganismo faz parte da microbiota natural do pescado. Os autores referem que a sua presença também pode ocorrer devido a contaminação cruzada. Dado que algumas bactérias, como *Vibrio* spp., encontram-se naturalmente presentes no ambiente marinho, as medidas de prevenção, são o cumprimento de boas práticas de higiene e de fabrico durante todo o processo, a fim de evitar a multiplicação em matérias-primas contaminadas, e a contaminação cruzada (Huss *et al.*, 2000).

Adicionalmente, no nosso estudo, em duas amostras suspeitas, provenientes de hipermercado, foram feitos estudos adicionais (identificação microbiológica por VITEK® MS),

e revelaram a presença de bactérias do género *Aeromonas* spp., nomeadamente *A. caviae* e *A. hydrophila*. Tal como ocorreu neste estudo, todas as amostras de Atanassova *et al.*, (2008) foram negativas relativamente à presença de *Vibrio* spp., no entanto, durante o decurso da pesquisa, o estudo de colónias suspeitas foram identificadas como *Aeromonas* spp., sendo que a prevalência destes microrganismos foi mais elevada em amostras de *sushi* fresco (20%) do que em amostras de *sushi* congelado (Atanassova *et al.*, 2008).

As bactérias do género *Aeromonas* spp. encontram-se naturalmente presentes no ambiente marinho, pertencem à família *Vibrionaceae*, e compreendem bactérias potencialmente patogénicas, frequentemente isoladas em produtos de origem marinha, e associadas a infeções por ingestão de água e frutos do mar contaminados, sendo a gastroenterite a infeção mais comumente relatada (Hoel, Vadstein & Jakobsen, 2018). São associadas a alimentos variados, pela sua capacidade de crescer em condições ambientais distintas, desde temperaturas de $< 0^{\circ}\text{C}$ a 45°C com temperatura ótima de crescimento em volta dos 28°C , para a maioria das espécies, e geralmente são sensíveis a $\text{pH} < 6$. Representam um risco para a segurança alimentar, devido ao potencial de virulência de algumas espécies, à sua capacidade de crescimento a temperaturas de refrigeração, assim como à sua tolerância a baixos valores de pH já ter sido relatada (Hoel *et al.*, 2018). Assim, a manutenção dos produtos a temperaturas de refrigeração pode não ser suficiente para impedir o crescimento de *Aeromonas* spp, a correta acidificação do arroz e a manutenção dos produtos a $\leq 4^{\circ}\text{C}$ são medidas preventivas ao crescimento destes microrganismos (Hoel *et al.*, 2018).

10.3. Avaliação da qualidade microbiológica por variedade de peixe analisada

No gráfico 4 encontra-se a distribuição do número total de amostras de *sushi* analisadas, por variedade de peixe, relativamente à sua qualidade microbiológica.

Das 62 amostras de *sushi* analisadas 40,3% (25/62) foram confeccionadas com atum (variedade A), 50% (31/62) foram confeccionadas com salmão (variedade B), e 9,7% (6/62) foram confeccionadas com camarão (variedade C) (gráfico 4).

Na avaliação microbiológica das 25 amostras da variedade A, confeccionada com atum, 64% (16/25) foram classificadas com um nível de qualidade Não Satisfatório, 24% (6/25) foram classificadas como Questionável, e apenas 12% (3/25) das amostras foram classificadas com nível microbiológico Satisfatório (gráfico 4).

A avaliação microbiológica das 31 amostras da variedade B, confeccionada com salmão, revelou 29% (9/31) das amostras com nível microbiológico Não Satisfatório, 48,4%

(15/31) com nível Questionável e 22,6% (7/31) com nível microbiológico Satisfatório (gráfico 4).

Relativamente à avaliação microbiológica das 6 amostras da variedade C, confeccionada com camarão, 83,4% (5/6) foram classificadas com um nível microbiológico Não Satisfatório, e 16,6 % (1/6) com nível microbiológico Questionável (gráfico 4).

A variedade A confeccionada com atum, apresentou maior número de amostras classificadas com um nível de qualidade microbiológica Não Satisfatório [64% (16/25)] comparativamente com a variedade B [29% (9/31)] confeccionada com salmão, no entanto a variedade B apresentou maior número de amostras Questionáveis [48,4% (15/31)] comparativamente com a variedade A [24% (6/25)] (gráfico 4). Relativamente à variedade C, confeccionada com camarão, nenhuma das 6 amostras analisadas foi considerada com nível microbiológico Satisfatório, embora o número de amostras seja reduzido nesta variedade, há que realçar que 83,4% (5/6) foram consideradas com nível microbiológico Não Satisfatório.

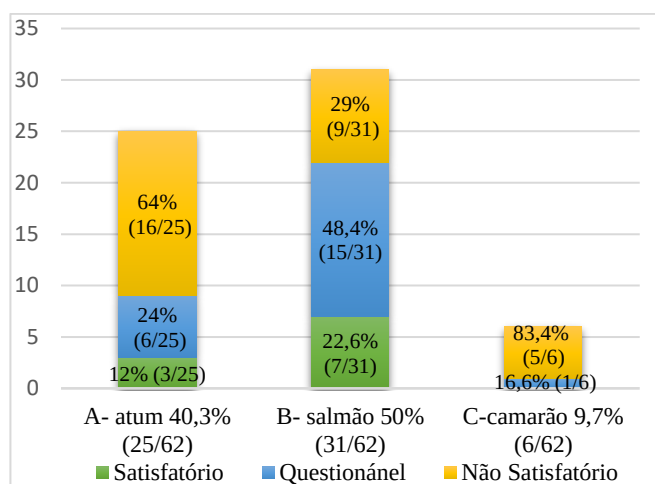


Gráfico 4- Distribuição das amostras de *sushi*, quanto ao nível de qualidade microbiológica, por variedade de peixe.

10.4. Resultados obtidos nas análises microbiológicas realizadas por variedade de peixe

A tabela 13 mostra as médias de contagem, desvio padrão e os valores mínimos e máximos obtidos, por parâmetro microbiológico analisado, em cada variedade de peixe, e por superfície comercial.

Entre as diferentes variedades, a variedade de salmão apresentou resultados mais favoráveis, comparativamente com atum e camarão, relativamente à média de contagem total dos parâmetros microbiológicos analisados (tabela 13).

Tabela 13- Médias de contagem expressos em log ufc/g, desvio padrão, e valores mínimos e máximos obtidos, por parâmetro microbiológico analisado, por variedade de peixe, e por superfície comercial.

	Variedade	TOTAL					Hipermercado					Restaurante				
		n	Média	Dp	Min	Máx	n	Média	Dp	Min	Máx	n	Média	Dp	Min	Máx
log AC	Atum	25	7,00	0,98	4,79	8,08	13	6,93	0,85	5,23	8,08	12	7,07	1,13	4,79	8,08
	Salmão	31	6,36	1,07	4,57	8,69	14	6,15	1,04	4,83	8,04	17	6,54	1,09	4,57	8,69
	Camarão	6	6,92	1,06	5,32	8,08	4	7,23	0,91	6,15	8,08	2	6,31	1,40	5,32	7,30
log EB	Atum	25	4,27	1,09	2,52	6,23	13	4,22	0,96	2,72	5,96	12	4,32	1,26	2,52	6,23
	Salmão	31	3,97	1,25	1,00	6,83	14	4,51	1,11	3,11	6,83	17	3,53	1,20	1,00	5,32
	Camarão	6	4,65	1,54	2,34	6,40	4	5,40	1,13	4,18	6,40	2	3,15	1,15	2,34	3,96
log STA	Atum	7	1,48	0,46	1,00	2,11	1	1,00	-	1,00	1,00	6	1,56	0,45	1,00	2,11
	Salmão	7	1,33	0,42	1,00	2,18	1	2,18	-	2,18	2,18	6	1,19	0,22	1,00	1,51
	Camarão	1	2,00		2,00	2,00	-	-	-	-	-	1	2,00	-	2,00	2,00
log BC	Atum	14	2,06	0,70	1,00	3,43	7	2,47	0,47	2,11	3,43	7	1,65	0,67	1,00	2,72
	Salmão	9	1,28	0,57	1,00	2,54	4	1,00	0,00	1,00	1,00	5	1,51	0,71	1,00	2,54
	Camarão	3	1,66	0,67	1,00	2,34	1	1,63	-	1,63	1,63	2	1,67	0,95	1,00	2,34

AC- microrganismos aeróbios mesófilos; EB- *Enterobacteriaceae*; STA- *Estafilococos* coagulase positiva; BC- *Bacillus cereus*; n- número de amostras; Dp- desvio padrão; Min- mínimo; Máx- máximo.

Moura (2015) analisou 60 amostras de *sashimi* de diferentes variedades de peixe, provenientes de 20 estabelecimentos típicos e não típicos. Relativamente à contagem de microrganismos aeróbios mesófilos obteve como média global de contagem em amostras de atum 5,93 log ufc/g (estabelecimento não típico) e 5,42 log ufc/g (estabelecimento típico), enquanto que no nosso estudo para amostras de *sushi* com atum as médias foram de 6,93 e 7,07 log ufc/g em hipermercado e restaurante, respetivamente (tabela 13). Em amostras de salmão detetou 6,02 e 5,02 log ufc/g em estabelecimentos não típicos e típicos, respetivamente, e no nosso estudo, para a mesma variedade de pescado, foram detetados valores de 6,15 e 6,54 log ufc/g em hipermercado e restaurante, respetivamente (tabela 13). Relativamente a amostras de camarão apenas uma amostra, proveniente de estabelecimento típico com valor de 5,60 log ufc/g (Moura, 2015), enquanto no nosso estudo a média de contagem em amostras com camarão na sua composição foi 7,23 log ufc/g em hipermercado e 6,31 log ufc/g, em restaurante (tabela 13). No nosso estudo a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos foi mais elevada em todas as variedades analisadas comparativamente a Moura (2015), o que pode dever-se às nossas amostras serem compostas por mais ingredientes, para além do peixe, e consequentemente a contagem de microrganismos mesófilos depender da qualidade microbiológica de cada ingrediente utilizado na constituição das peças.

A presença de espécies de *Vibrio* foi detetada em amostras de salmão, atum e robalo, e de *Listeria monocytogenes* em amostras de salmão, atum, robalo e peixe manteiga (Moura,

2015), no nosso estudo não foram detetadas espécies de *Vibrio* nem *Listeria monocytogenes* em nenhuma das variedades analisadas. De igual modo, Moura, (2015) não detetou a presença de *Salmonella* spp. em nenhuma variedade de *sushi*, tal como ocorreu no presente estudo. Em outro estudo, Atanassova *et al.* (2008) obtiveram valores de microrganismos aeróbios mesófilos em amostras de *nigiri* de salmão entre 4,8 - 7,3 log ufc/g, no nosso estudo na variedade de salmão os valores variaram entre 4,57 e 8,69 log ufc/g (tabela 13). Relativamente mais elevado que nas amostras de salmão, nas amostras com atum, os valores de contagem para o mesmo parâmetro variaram entre 5,7 – 8,0 log ufc/g (Atanassova *et al.*, 2008), no nosso estudo, na variedade de atum variaram entre 4,79 – 8,08 log ufc/g (tabela 13). Relativamente à presença de *E. coli* os valores foram de 2,2 log ufc/g e 2,0 log ufc/g em amostras de salmão e atum, respetivamente (Atanassova *et al.*, 2008), enquanto no nosso estudo a presença de *E. coli* apenas foi detetada em uma amostra com valor de 1,00 log ufc/g na variedade de atum.

Em Hong Kong, foram isolados *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de *sashimi* de salmão, ovas de peixe e camarão respetivamente (FEHD, 2000), enquanto no nosso estudo não foram detetados estes microrganismos em nenhuma das variedades analisadas, contudo, no decorrer da pesquisa de *Vibrio* spp. foram identificadas duas espécies de *Aeromonas*, nomeadamente *A. caviae* em uma amostra de salmão, e *A. hydrophila* em uma amostra de camarão.

Como referido anteriormente, a contaminação do pescado é influenciada pelo local de captura, manuseio e acondicionamento pós-captura. Na contaminação das variedades de pescado do nosso estudo, podem ainda ter influência os demais ingredientes que constituem as peças, visto serem peças compostas por vários ingredientes para além do pescado, nunca esquecendo que além do risco das matérias-primas estarem contaminadas, os resultados podem ser influenciados pela manipulação durante a preparação.

Com o objetivo de comparar os valores de contagem em função da variedade, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, este é um teste não-paramétrico apropriado para comparar as distribuições de duas ou mais variáveis pelo menos ordinais, observadas em duas ou mais amostras independentes (Marôco, 2014).

As análises estatísticas revelaram que existem diferenças significativas na comparação da contagem dos microrganismos, entre as diferentes variedades de peixe, dentro da mesma superfície comercial. No hipermercado na contagem de AC ($p=0.053$) (tabela 14), cuja média foi superior na variedade de camarão, seguindo-se pela variedade de atum, e por fim na

variedade de salmão. E na contagem de BC ($p=0.012$) (tabela 14), cuja média foi superior na variedade de atum, seguindo-se na variedade de camarão e por fim na variedade de salmão.

Tabela 14 – Resultados estatísticos obtidos após aplicado o teste de Kruskal-Wallis, na comparação da contagem dos microrganismos em estudo, entre as variedades de peixe analisadas, dentro de cada superfície comercial.

		Hipermercado					Restaurante				
Variedade		n	Média	Dp	Min	Máx	n	Média	Dp	Min	Máx
log AC	Atum	13	6,93	0,85	5,23	8,08	12	7,07	1,13	4,79	8,08
	Salmão	14	6,15	1,04	4,83	8,04	17	6,54	1,09	4,57	8,69
	Camarão	4	7,23	0,91	6,15	8,08	2	6,31	1,40	5,32	7,30
$p = 0,053$						$p = 0,203$					
log EB	Atum	13	4,22	0,96	2,72	5,96	12	4,32	1,26	2,52	6,23
	Salmão	14	4,51	1,11	3,11	6,83	17	3,53	1,20	1,00	5,32
	Camarão	4	5,40	1,13	4,18	6,40	2	3,15	1,15	2,34	3,96
$p = 0,291$						$p = 0,219$					
log BC	Atum	7	2,47	0,47	2,10	3,40	7	1,65	0,67	1,00	2,70
	Salmão	4	1,00	0,00	1,00	1,00	5	1,51	0,71	1,00	2,50
	Camarão	1	1,63	-	1,60	1,60	2	1,67	0,95	1,00	2,30
$p = 0,012$						$p = 0,938$					
log STA	Atum	1	1,00	-	1,00	1,00	6	1,56	0,45	1,00	2,11
	Salmão	1	2,18	-	2,18	2,18	6	1,19	0,22	1,00	1,51
	Camarão	-	-	-	-	-	1	2,00	-	2,00	2,00
$p = 0,317$						$p = 0,170$					

AC- microrganismos aeróbios mesófilos; **EB**- *Enterobacteriaceae*; **BC**- *Bacillus cereus*; **STA**- *Estafilococos* coagulase positiva; **n**- número de amostras; **Dp**- desvio padrão; **Min**- mínimo; **Máx**- máximo; **Valores apresentados a negrito**- Diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes variedades de peixe, dentro da mesma superfície comercial.

10.5. Distribuição das amostras classificadas com nível microbiológico Não Satisfatório por variedade de peixe e por superfície comercial

No gráfico 5 encontra-se a distribuição das amostras classificadas com um nível microbiológico Não Satisfatório por variedade de peixe, e por superfície comercial. Foram consideradas com um nível microbiológico Não Satisfatório: 25,8% (16/62) das amostras da variedade A, confeccionada com atum [das quais, 14,5% (9/62) foram provenientes do hipermercado e 11,3% (7/62) do restaurante], 14,5% (9/62) das amostras da variedade B, confeccionada com salmão [com 8% (5/62) do hipermercado e 6,5% (4/62) do restaurante] e 8% (5/62) das amostras da variedade C, confeccionadas com camarão [com 4,8% (3/62) e 3,2% (2/62) em hipermercado e restaurante, respetivamente] (gráfico 5).

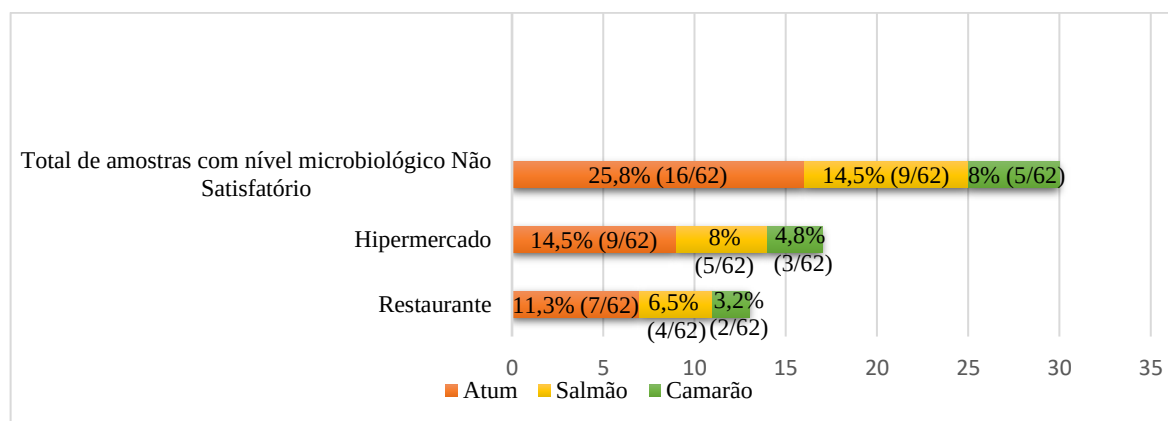


Gráfico 5- Distribuição das amostras de *sushi* classificadas com nível microbiológico Não Satisfatório, por variedade de peixe e por superfície comercial.

10.5.1. Parâmetros envolvidos na classificação Não Satisfatório das amostras

Na tabela 15 estão os parâmetros acima do Valor Máximo Admitido que deram origem à classificação Não Satisfatório das amostras, por variedade de peixe e por superfície comercial.

Todas as variedades de *sushi* apresentaram contagens Não Satisfatórias para os parâmetros AC e EB, sendo que, o hipermercado apresentou maior número de amostras com contagens superiores ao VMA em ambos os parâmetros [14,5% (9/62) e 3,2% (2/62) amostras com AC e EB, respectivamente] comparativamente ao restaurante [9,7% (6/62) e 1,6% (1/62) amostras com AC e EB, respectivamente] (tabela 15).

Duas amostras foram classificadas com nível microbiológico Não Satisfatório, devido à contaminação com STA acima do VMA ($10^2 - \leq 10^4$), tendo sido detetado uma amostra [1,6% (1/62)] na variedade de salmão de hipermercado, e a outra [1,6% (1/62)] na variedade de camarão proveniente de restaurante (tabela 15).

Enquanto todas as variedades de *sushi* apresentaram contaminação com AC e EB em simultâneo [6,4% (4/62) das amostras no hipermercado e 4,8% (3/62) no restaurante], apenas uma amostra [1,6% (1/62)], da variedade de atum proveniente de restaurante com AC e STA acima do VMA, e outra amostra [1,6% (1/62)] também da variedade de atum, mas de hipermercado, com AC e BC acima do VMA, foram consideradas Não Satisfatórias (tabela 15). Por outro lado, apenas uma amostra [1,6% (1/62)] na variedade de atum de restaurante foi considerada como Não Satisfatória com três parâmetros (AC, EB e STA) acima do VMA (tabela 15).

Tabela 15 – Distribuição das amostras classificadas com nível microbiológico Não Satisfatório em cada variedade de peixe, por superfície comercial, e os parâmetros que deram origem a essa classificação.

	% (n°) de amostras Não Satisfatórias	Com um parâmetro acima do VMA	Com dois parâmetros acima do VMA			Com três parâmetros acima do VMA		
		AC % (n)	EB % (n)	STA % (n)	AC/EB % (n)	AC/STA % (n)	AC/BC % (n)	AC/EB/STA % (n)
Atum	25,8% (16/62)	14,5% (9/62)	1,6% (1/62)	–	4,8% (3/62)	1,6% (1/62)	1,6% (1/62)	1,6% (1/62)
Salmão	14,5% (9/62)	6,4% (4/62)	1,6% (1/62)	1,6% (1/62)	4,8% (3/62)	–	–	–
Camarão	8% (5/62)	3,2% (2/62)	1,6% (1/62)	1,6% (1/62)	1,6% (1/62)	–	–	–
Hipermercado	27,4% (17/62)	14,5% (9/62)	3,2% (2/62)	1,6% (1/62)	6,4% (4/62)	–	1,6% (1/62)	–
Restaurante	21% (13/62)	9,7% (6/62)	1,6% (1/62)	1,6% (1/62)	4,8% (3/62)	1,6% (1/62)	–	1,6% (1/62)

VMA – Valor Máximo Admissível; **AC**- microrganismos aeróbios mesófilos; **EB**- *Enterobacteriaceae*; **STA**- *Estafilococos coagulase positiva*; **BC**- *Bacillus cereus*; **(n)** – número de amostras.

De um modo geral, as amostras de atum [25,8% (16/62)] encontravam-se com um nível de qualidade microbiológico inferior comparativamente às amostras de salmão [14,5% (9/62)] (tabela 15). Relativamente à superfície comercial, o hipermercado apresentou maior número de amostras com nível microbiológico Não Satisfatório [27,4% (17/62)] comparativamente ao restaurante [21% (13/62)]. Por ordem decrescente, os parâmetros que mais contribuíram para a classificação Não Satisfatório das amostras foram: AC [24,2% (15/62)] seguindo-se por AC/EB [11,2% (7/62)], EB [4,8% (3/62)], STA [3,2% (2/62)] e [1,61% (1/62)] em AC/STA, AC/BC e AC/EB/STA (tabela 15). Os resultados refletem falhas em alguma etapa da cadeia, nas boas práticas de higiene e de fabrico por parte dos manipuladores, nomeadamente no controlo de temperatura e qualidade higiénica das matérias-primas.

Com o objetivo de comparar se existem diferenças estatisticamente significativas nas contagens de microrganismos, entre as duas superfícies comerciais, para a mesma variedade de pescado, foi aplicado o teste de Mann-Whitney que é o teste não-paramétrico adequado para comparar as funções de distribuição de pelo menos uma variável ordinal, medida em duas amostras independentes (Marôco, 2014).

Os resultados indicam que existem diferenças estatisticamente significativas em EB na variedade de salmão ($p=0.054$), assim como em BC na variedade atum ($p=0.047$) cujas médias foram superiores no hipermercado (tabela 16).

Tabela 16- Resultados estatísticos obtidos após aplicado o teste de Mann-Whitney, para comparação das contagens por parâmetro, entre as superfícies comerciais, para a mesma variedade de peixe analisada.

	Variedade	Hipermercado			Restaurante			Dif	p
		n	Média	Dp	n	Média	Dp		
log AC	Atum	13	6,93	0,9	12	7,07	1,1	0,14	0,605
	Salmão	14	6,15	1,0	17	6,54	1,1	0,40	0,197
	Camarão	4	7,23	0,9	2	6,31	1,4	-0,92	0,355
log EB	Atum	13	4,22	1,0	12	4,32	1,3	0,10	0,935
	Salmão	14	4,51	1,1	17	3,53	1,2	-0,98	0,054
	Camarão	4	5,40	1,1	2	3,15	1,1	-2,25	0,064
log BC	Atum	7	2,47	0,5	7	1,65	0,7	-0,82	0,047
	Salmão	4	1,00	0,0	5	1,51	0,7	0,51	0,081
	Camarão	1	1,63	-	2	1,67	0,9	0,04	1,000
log STA	Atum	1	1,00	-	6	1,56	0,4	0,56	0,203
	Salmão	1	2,18	-	6	1,19	0,2	-0,99	0,116
	Camarão	-	-	-	1	2,00	-	-	-

AC- microrganismos aeróbios mesófilos; EB- *Enterobacteriaceae*; BC- *Bacillus cereus*; STA- *Estafilococos* coagulase positiva; n- número de amostras; Dp- desvio padrão; **Valores apresentados a negrito**- Diferenças estatisticamente significativas entre as superfícies comerciais para a mesma variedade de pescado.

Com o objetivo de verificar se existe uma associação entre a apreciação dos microrganismos em estudo e a superfície comercial, foi aplicado o teste do Qui-Quadrado (χ^2) que serve para testar se duas ou mais populações (ou grupos) independentes diferem relativamente a uma determinada característica, isto é, se a frequência com que os elementos da amostra se repartem pelas classes de uma variável qualitativa é ou não aleatória (Marôco, 2014). Foi também utilizada a Continuity Correction no caso das tabelas de 2x2, bem como a correção de continuidade, e a significância do teste de Fisher quando sugerido pelo programa estatístico.

A tabela 17 é referente ao cruzamento da apreciação dos microrganismos em estudo e da superfície comercial, no total de amostras e em cada uma das variedades analisadas. Os resultados indicam que a apreciação dos microrganismos está associada à superfície comercial, isto é, que têm uma relação de dependência com a superfície comercial, nos seguintes casos: na

amostra total para o parâmetro EB ($p=0,055$), sendo a qualidade das amostras mais satisfatória no restaurante [68% (tabela 17)]; na variedade de salmão, no parâmetro AC ($p=0,037$), sendo a qualidade das amostras mais satisfatória no hipermercado (67%), e no parâmetro EB ($p=0,044$) sendo a qualidade das amostras mais satisfatória no restaurante [79% (tabela 17)]; na variedade de camarão, no parâmetro EB ($p=0,050$), sendo que apesar da amostra ser reduzida, a apreciação foi mais insatisfatória e questionável no hipermercado (tabela 17).

Tabela 17- Análises estatísticas referentes ao cruzamento da apreciação dos microrganismos e da superfície comercial, na amostra total e em cada variedade de peixe.

APRECIAÇÃO			AMOSTRA TOTAL				ATUM				SALMÃO				CAMARÃO				
			Hiper.	Rest.	Total	<i>p</i>	Hiper.	Rest.	Total	<i>p</i>	Hiper.	Rest.	Total	<i>p</i>	Hiper.	Rest.	Total	<i>p</i>	
log AC	Não satisfatório	n	14	11	25		8	7	15		4	3	7		2	1	3		
		%	56%	44%	100%		53%	47%	100%		57%	43%	100%		67%	33%	100%		
	Questionável	n	7	13	20		3	3	6		2	10	12		2	0	2		
		%	35%	65%	100%		50%	50%	100%		17%	83%	100%		100%	0%	100%		
	Satisfatório	n	10	7	17		2	2	4		8	4	12		0	1	1		
		%	59%	41%	100%		50%	50%	100%		67%	33%	100%		0%	100%	100%		
	Total		n	31	31	62		13	12	25		14	17	31		4	2	6	
			%	50%	50%	100%	0,261	52%	48%	100%	0,987	45%	55%	100%	0,037	67%	33%	100%	0,223
log EB	Não satisfatório	n	6	5	11		2	3	5		2	2	4		2	0	2		
		%	55%	45%	100%		40%	60%	100%		50%	50%	100%		100%	0%	100%		
	Questionável	n	17	9	26		6	5	11		9	4	13		2	0	2		
		%	65%	35%	100%		55%	46%	100%		69%	31%	100%		100%	0%	100%		
	Satisfatório	n	8	17	25		5	4	9		3	11	14		0	2	2		
		%	32%	68%	100%		56%	44%	100%		21%	79%	100%		0%	100%	100%		
	Total		n	31	31	62		13	12	25		14	17	31	(a)	4	2	6	
			%	50%	50%	100%	0,055	52%	48%	100%	0,834	45%	55%	100%	0,044	67%	33%	100%	0,050
log BC	Não satisfatório	n	1	0	1		1	0	1		1	0	1		-	-	-		
		%	100%	0%	100%		100%	0%	100%		100%	0%	100%		-	-	-		
	Questionável	n	1	1	2		-	-	-		-	-	-		0	1	1		
		%	50%	50%	100%		-	-	-		-	-	-		0%	100%	100%		
	Satisfatório	n	10	13	23		6	7	13		3	5	8		1	1	2		
		%	43%	57%	100%		46%	54%	100%		38%	63%	100%		50%	50%	100%		
	Total		n	12	14	26		7	7	14		4	5	9	(b)	1	2	3	(b)
			%	46%	54%	100%	0,537	50%	50%	100%	1,000	44%	56%	100%	0,444	33%	67%	100%	1,000

AC- microrganismos aeróbios mesófilos; EB- *Enterobacteriaceae*; BC- *Bacillus cereus*; STA- *Estafilococos* coagulase positiva; n- número de amostras; **Valores apresentados a negrito**- Diferenças estatisticamente significativas; (a)- Correção de Continuidade; (b)- Teste exato de Fisher.

10.7. Avaliação da qualidade microbiológica do total de amostras analisadas

O gráfico 6 representa a distribuição das 62 amostras de *sushi* colhidas nas duas superfícies comerciais, quanto à sua qualidade microbiológica. Das 62 amostras analisadas 48,4% (30/62), foram classificadas com nível microbiológico Não Satisfatório, das quais 27,4% (17/62) eram provenientes do hipermercado e 21% (13/62) do restaurante. Enquanto, 35,5% (22/62) das amostras foram classificadas com nível Questionável [16,1% (10/62) e 19,4% (12/62), em hipermercado e restaurante, respetivamente]. Apenas 16,1% (10/62) das amostras foram classificadas com nível microbiológico Satisfatório [6,4% (4/62) e 9,7% (6/62), em hipermercado e restaurante, respetivamente]. Entre as duas superfícies comerciais, o restaurante

apresentou resultados mais favoráveis relativamente ao hipermercado, a nível de amostras classificadas como Não Satisfatório e amostras classificadas como Satisfatório (gráfico 6).

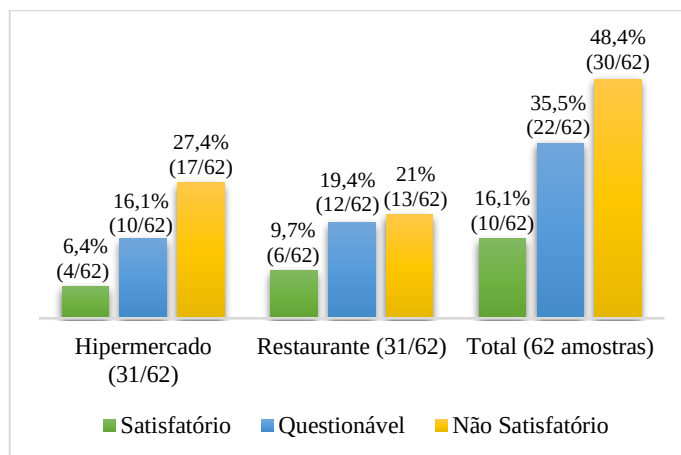


Gráfico 6- Distribuição amostras de *sushi*, quanto à sua qualidade microbiológica no total (62) de amostras analisadas, e por superfície comercial (31 Hipermercado/31 Restaurante).

A elevada percentagem de amostras classificadas com um nível de qualidade microbiológica “Não satisfatório” e “Questionável” no nosso estudo, revelam falhas em uma ou mais etapas da cadeia de produção destes alimentos prontos para consumo, sugerem baixa qualidade higiénica das matérias-primas, contaminação cruzada, falhas nas boas práticas de higiene e de fabrico por parte dos manipuladores de alimentos, e revelam a necessidade de controlo das operações.

Contudo, não podemos afirmar que a qualidade do *sushi* em restaurante seja melhor que em hipermercado, para tal, deveríamos ter colhido um maior número de amostras, alargar o leque de superfícies comerciais, e ainda realizar ensaios microbiológicos para contagem de bactérias ácido lácticas, que devido a limitações orçamentais não nos foi possível.

Conclusão

Embora já existam estudos sobre *sushi* pronto para consumo em Portugal, acreditamos que este trabalho permita ter uma perceção geral da qualidade deste produto comercializado no nosso país.

Das 62 amostras de *sushi* analisadas, 48,4% (30/62) apresentaram pelo menos um parâmetro microbiológico superior ao Valor Máximo Admissível. Os parâmetros microbiológicos analisados que mais contribuíram para a classificação “Não satisfatório” das amostras foram, os microrganismos aeróbios mesófilos e *Enterobacteriaceae*, seguindo-se *Estafilococos coagulase positiva* e *Bacillus cereus*.

Entre as variedades, a variedade de camarão, não obstante o reduzido número de amostras, apresentou níveis de contaminação mais elevados comparativamente com a variedade de atum e de salmão.

Comparando as duas superfícies, o restaurante apresentou melhores resultados face ao hipermercado em relação ao número de amostras classificadas com nível microbiológico Não Satisfatório [27,4% (17/62) em hipermercado e 21% (13/62) em restaurante] e Satisfatório [6,4% (4/62) em hipermercado e 9,7% (6/62) em restaurante].

Conclui-se com os resultados deste trabalho, que a incidência de microrganismos potencialmente patogénicos em *sushi* é bastante baixa, uma vez que não foram detetadas a presença de *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio vulnificus*. Embora a presença de *Bacillus cereus* e *Estafilococos coagulase positiva* tenha sido detetada em níveis Não Satisfatório em 1,6% (1/62) e 6,4% (4/62) das amostras, respetivamente, nenhuma das amostras revelou um nível microbiológico Não satisfatório/potencialmente perigoso.

No entanto, e como anteriormente referido, o elevado número de amostras classificadas com um nível de qualidade microbiológica “Não satisfatório” e “Questionável” evidência a necessidade de rever as boas práticas de higiene, incluindo o controlo de temperatura e a qualidade das matérias-primas utilizadas, de forma a obter um produto final com o nível de qualidade pretendido.

Considerando as características particulares desta categoria de género alimentício, é ainda de salientar a importância dos operadores que produzem e comercializam este tipo de alimentos, implementarem programas de vigilância microbiológica, que os ajudem a estabelecer um sistema de gestão da segurança alimentar eficaz, como a medição do pH do arroz, e alertarem os consumidores que o consumo destes produtos deverá ser evitado por

populações pertencentes a grupos de risco (ex. indivíduos cujo sistema imunitário se encontre comprometido entre os quais grávidas, crianças, idosos).

Embora não tenham sido detetados microrganismos potencialmente patogénicos em níveis Não satisfatório/potencialmente perigoso no nosso estudo, é importante que os estabelecimentos cumpram os pré-requisitos de higiene de forma a garantir a segurança do produto.

Assim, face aos resultados obtidos, seria interessante num estudo futuro, para além do que já foi acima mencionado: analisar *sushi* na condição de atmosfera modificada e estabelecer a comparação com *sushi* fresco; recolher um maior número de amostras com camarão na sua composição; estabelecer a comparação entre *sushi* e *sashimi*; realizar a medição de pH; analisar os ingredientes antes da preparação das peças e, se possível, realizar zaragatoas aos utensílios, superfícies de contacto com os alimentos e mãos dos manipuladores.

Bibliografia:

- Adams, M. R., Moss, M. O., & McClure P. (2016). Food Microbiology (4ª ed., p. 562). United Kingdom: The Royal Society of Chemistry.
- Afonso, A. (2008). Análise de perigos - Identificação dos perigos e avaliação dos riscos para a segurança alimentar. *Segurança e qualidade alimentar*, **5**, 26–28.
- Amaral, R., & Oliveira, B. (2013). Perigos Físicos: Importância da sua Identificação para Sistema de Segurança Alimentar. *Revista Nutricías*, **19**, 10–12. Acedido em 14 de julho de 2019 em: <http://www.scielo.mec.pt/pdf/nut/n19/n19a03.pdf>
- Amson, G. V., Haracemiv, S. M. C., & Masson, M. L. (2006). Data research of foodborne diseases outbreaks from state of Paraná – Brazil, in the period from 1978 to 2000. *Ciênc agrotec Lavras*, **30**(6), 1139-1145.
- Atanassova, V., Reich, F., & Klein, G. (2008). Microbiological Quality of Sushi from Sushi Bars and Retailers. *J. Food Prot*, **71**(4), 860-864.
- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica [ASAE]. (2006). *Vibrio*. Acedido em 2 de outubro de 2019 em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/vibrio.aspx>
- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica [ASAE]. (2007a). *Salmonella*. Acedido em 27 de setembro de 2019 em: <http://www.asae.gov.pt/?cn=541054135462AAAAAAAAAAAAA>
- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica [ASAE]. (2007b). *Escherichia coli*. Acedido em 1 de outubro de 2019 em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/escherichia-coli.aspx>
- Baptista, P., & Venâncio, A. (2003). Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos. Guimarães: Forvisão. Acedido em 2 de Setembro de 2019 em: https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/33398/1/document_2748_1.pdf
- Barber, K., & Takemura, H. (2014). Sushi receitas e técnicas. Barcelona: Marcador Editora.
- Basti, A. A., Misaghi, A., Salehi, Z. T., & Kamkar, A. (2006). Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. *Food Control*, **17**, 183-188.
- Baylis, C., Uyttendaele, M., Joosten, H., & Davies, A. (2011). The *Enterobacteriaceae* and their significance to the food industry. *ILSI Europe*, 2011, 1-48. Acedido em 19 de maio de 2019 em: <https://ilsi.eu/publication/the-enterobacteriaceae-and-their-significance-to-the-food-industry/>
- Beuchat, L. R. (2006). Vectors and conditions for preharvest contamination of fruits and

- vegetables with pathogens capable of causing enteric diseases. *Br Food J*, **108**(1), 38–53.
- BIOKAR Diagnostics (2018). Fiche technique – Bouillon Tryptone-Sel. Acedido em 10 de junho de 2019 em: http://www.solabia.com/Produto_162,9/BIOKAR-Diagnostics/TRYPSTONE-SEL---Bouillon-.html
- bioMérieux, (2014a). Caldo FRASER - 1/2 Concentração (FRASER 1/2). Acedido em 5 de junho de 2019 em: https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/44340001-44341000/Package_Insert_-_08491_-_I_-_pt_-_42048_-_42112_-_42627_-_42727.pdf
- bioMérieux, (2014b). Caldo SX2 (SX2-T). Acedido em 5 de junho de 2019 em: https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/52818001-52819000/Package_Insert_-_13882_-_C_-_pt_-_42121.pdf
- bioMérieux, (2014c). Caldo FRASER - (FRASER T). Acedido em 5 de junho de 2019 em: https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/52809001-52810000/Package_Insert_-_12560_-_C_-_pt_-_42072.pdf
- bioMérieux, (2014d). Tempo[®] AC (Flora total). Acedido em 5 de junho de 2019 em: https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/41105001-41106000/Package_Insert_-_9301732_-_C_-_fr_-_411113.pdf
- bioMérieux, (2015a). IBISA[®] - Meio seletivo para a deteção de *Salmonella* spp. Acedido em 7 de junho de 2019 em: https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/53250001-53251000/Package_Insert_-_520060_-_E_-_pt_-_IBISA.pdf
- bioMérieux, (2015b). Gelose Trypticase Soja (TSA). Acedido em 7 de junho de 2019 em: https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/61255001-61256000/Package_Insert_-_11613_-_D_-_pt_-_43011_-_43019.pdf
- bioMérieux, (2016a). Água peptonada tamponada (BPW). Acedido em 2 de junho de 2019 em: https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/66084001-66085000/Package_Insert_-_08441_-_H_-_pt_-_42042_-_42043_-_42111_-_42729.pdf
- bioMérieux, (2016b). Gelose XLD (XLD). Acedido em 4 de junho de 2019 em: https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/83886001-83887000/Package_Insert_-_04588501_-_pt_-_43563_-_43564.pdf

- bioMérieux, (2016c). Vitek MS. Acedido a 26 de outubro de 2019 em:
https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/User_Manual/71582001-71583000/User_Manual_-_161150-854_-_A_-_pt_-_VITEK_MS_-_Industry_Safety_and_Start_Up_Guide.pdf
- bioMérieux, (2018a). Tempo[®] EC (*E. coli*). Acedido em 5 de junho de 2019 em:
https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/108476001-108477000/Package_Insert_-_12597_-_M_-_pt_-_80004.pdf
- bioMérieux, (2018b). VIDAS[®] *Salmonella* (SLM). Acedido em 5 de junho de 2019 em:
https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/94456001-94457000/Package_Insert_-_06984_-_Y_-_pt_-_30702.pdf
- bioMérieux, (2018c). VIDAS[®] *Listeria monocytogenes* II (LMO2). Acedido em 5 de junho de 2019 em:
https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/104314001-104315000/Package_Insert_-_11600_-_R_-_pt_-_30704.pdf
- bioMérieux, (2019a). Tempo[®] EB (*Enterobacteriaceae*). Acedido em 6 de junho de 2019 em:
https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/112530001-112531000/Package_Insert_-_12596_-_H_-_pt_-_80003.pdf
- bioMérieux, (2019b). Tempo[®] STA. Acedido em 5 de junho de 2019 em:
https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/111226001-111227000/Package_Insert_-_12595_-_I_-_pt_-_80002.pdf
- bioMérieux, (2019c). Tempo[®] BC (*B. cereus*). Acedido em 5 de junho de 2019 em:
https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/112226001-112227000/Package_Insert_-_9302582_-_C_-_pt_-_80106.pdf
- Bundesinstitut für Risikobewertung [BfR]. (2020). *Escherichia coli*. Food safety, Microbial risks, Bacteria. Acedido a 20 de janeiro de 2019 em:
https://www.bfr.bund.de/en/escherichia_coli-54353.html
- Center for Disease Control and Prevention [CDC]. (2012). Multistate Outbreak of *Salmonella* Bareilly and *Salmonella* Nchanga Infections Associated with a Raw Scraped Ground Tuna Product (Final Update). Acedido em 6 de junho de 2019 em:
<https://www.cdc.gov/salmonella/bareilly-04-12/>
- Council for Agricultural Science and Technology [CAST]. (1994). Foodborne pathogens: risks and consequences. Task Force Report No. 122. Ames, Iowa
- Chai, J. Y., Murrell, K. D., & Lymbery, A. J. (2005). Fish-borne parasitic zoonoses: Status and

- issues. *Int J Parasitol*, **35**(11–12), 1233–1254.
- Chromagar, (2019). CHROMagar™ Vibrio. Acedido em 8 de junho de 2019 em: http://www.chromagar.com/fichiers/1557827526LF_EXT_008_VB_V6.0.pdf
- Codex Alimentarius Commission [CAC]. (2003). “Código internacional de práticas recomendadas – princípios gerais de higiene dos alimentos” CAC/RCP 1-1969 Rev.4.
- Condalab, (2019). Ficha técnica- Base de Agar Cromogénico para Listeria de Acuerdo a Ottaviani y Agosti (ALOA) ISO. Acedido em 7 de junho de 2019 em: https://www.condalab.com/int/en/ready-to-use-media/1784-8215-listeria-chromogenic-agar-according-to-ottaviani-and-agosti-aloa-iso.html#/34-formato-20_plates
- Corsolini, S., Ademollo, N., Romeo, T., Greco, S., & Focardi, S. (2005). Persistent organic pollutants in edible fish: A human and environmental health problem. *Microchem J*, **79**, 115–123.
- Costa, L. G., & Fattori, V. (2010). Health risks associated with fish consumption focus on methylmercury, dioxins and dioxin-like PCBs. Joint FAO/WHO expert consultation on the risks and benefits of fish consumption. Rome, Italy. Acedido em 7 de julho de 2019 em: <http://www.fao.org/3/k7107e/k7107e.pdf>
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**(4), 822-880.
- Cruz, A. R., Mateus, T. L., & Rocha, H. (2015). Perigos alimentares no pescado - Os perigos químicos. *TecnoAlimentar*, (3), 16–21. Acedido em 9 de setembro de 2019 em: https://www.researchgate.net/publication/319234347_PERIGOS_ALIMENTARES_NO_PESCADO_Os_perigos_quimicos
- D'Aoust, J-Y., & Maurer, J. (2007). *Salmonella* Species. In Doyle, M. P. & Beauchat, R. (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* (3ª Ed., pp. 187-236). Washington, DC: ASM Press.
- Demetrio, A. A., da Silva, G. D., Agnani, J. A. T., de Siqueira, L. P., Padilha, M. R. F., Oliveira, A. M., et. al., (2009). Culinária Japonesa: Alimentação saudável. Acedido em 18 de Setembro de 2019 em: www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/r0625-3.pdf
- de Queiroz, C., Albuquerque M., Pinheiro, K., Cossolosso, D., Alves, F., & Gomes, M. (2019). Pontos críticos no controle sanitário da fabricação de sushis. *Ciência animal*, **29**(1), 1–14.
- de Santana, E. H. W., Beloti, V., Aragon-alegro, L. C., & de Mendonça, M. B. O. C. (2010). Estafilococos em alimentos. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, **77**(3), 545–554.

- Dias, J. (2018). Consumo de peixe cru: Aspectos microbiológicos e surtos (Trabalho de Conclusão de curso). Universidade Federal de Uberlândia. Acedido em 6 de julho de 2019 em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/24180>
- Domingo, J. L. (2016). Nutrients and chemical pollutants in fish and shellfish. Balancing health benefits and risks of regular fish consumption. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **56**(6), 979–988.
- Dórea, J. G. (2008). Persistent, bioaccumulative and toxic substances in fish: Human health considerations. *Sci Total Environ*, **400**(1–3), 93–114.
- Drobniewski, F. A. (1993). *Bacillus cereus* and Related Species. *Clin Microbiol Rev*, **6**(4), 324–338.
- European Food Safety Authority [EFSA](2013). Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. *EFSA Journal*, **11**(4), 3138. Acedido em 8 de julho de 2019 em: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3138>
- Eglezos, S., Huang, B., Dykes, G. A., & Fegan, N. (2010). The Prevalence and Concentration of *Bacillus cereus* in Retail Food Products in Brisbane, Australia. *Foodborne Pathog Dis*, **7**(7), 867-870.
- Eliseu, N. (2018). Avaliação microbiológica de sushi comercializado em supermercados e em restauração. (Dissertação de mestrado). Universidade de Lisboa. Acedido em 4 de agosto de 2019 em: <http://hdl.handle.net/10400.5/17877>
- Feng, C. (2012). The Tale of Sushi: History and Regulations. *Compr Rev Food Sci F*, **11**(2), 205–220.
- Food Environmental Hygiene Department [FEHD]. (2000). Microbiological Hazards Evaluation - Sushi & sashimi in Hong Kong. Risk Assessment Studies, (2), 4-31. Acedido em 17 de Outubro de 2019 em: http://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme_haccp/files/ss_ras2_eng.pdf
- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization [FAO/WHO]. (2011). Risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: Interpretative summary and technical report. Rome, 16, pp. 33. Consultado a 5 de julho de 2019 em: <http://www.fao.org/3/a-i2225e.pdf>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (2014). Empres Food Safety. Consultado a 5 de julho de 2019 em: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/empres-food-safety/en/>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (2019). Assessment and Management of Seafood Safety and Quality. Acedido em 5 de julho de 2019 em:

<http://www.fao.org/3/y4743e/y4743e0j.htm>

- Food and Drug Administration [FDA]. (2019). Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. (4^a ed., cap. 7, pp. 113–115).
- Garcia, J. L., Francisqueti, F. V., Ferraz, A. P. da C. R., Ferron, A. J. T., Costa, M. R., Gregolin, C. S. et. al., (2019). High Sugar-Fat Diet Induces Metabolic-Inflammatory Disorders Independent of Obesity Development. *Food Nutr Sci*, **10**(06), 664–677.
- Garrido, V., Mobley, R., Otwell, S., & Schneider, K. (2004). Guidance for Processing Sushi in Retail Operations. AFDO, 5-19. Acedido em 5 de junho de 2019 em: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/FS/FS11700.pdf>
- Gastalho, S., da Silva, G. J., & Ramos, F. (2014). Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: impacto em saúde pública. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, **3**(1), 29–45. Acedido em 17 de junho de 2019 em: <http://www.actafarmacapeuticaportuguesa.com/index.php/afp/article/viewFile/40/52>
- Germano, P. M. L., Oliveira, J. C. F., & Germano, M. I. S. (1993). O pescado como causa de toxinfecções bacterianas. *Rev. Hig. Alim.*, **7**(28), 40-44.
- Girardet, J. P. (2012). Bénéfices nutritionnels et risques potentiels de la consommation de poisson. Le Dossier: Risques Alimentaires Chez l'enfant. *Réalités pédiatriques*, **172**, 1–4.
- Gonzalez-Escalona, N., Meng, J., & Doyle, M. P. (2019). Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. In Doyle, M. P., Diez-Gonzalez, F. & Hill, C. (Eds), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* (5^a Ed., pp. 289-315). Washington, DC: ASM Press.
- Granum, P. E. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett*, **157**, 223–228.
- Granum, P. E. (2007). *Bacillus cereus*. In Doyle, M. P & Beauchat, R. (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* (3^a Ed., pp. 445-455). Washington, DC: ASM Press.
- Guimarães, Í., Souza, A., Cornélio, V., Pereira, J., & Villela, V. (2010). Identificação de *Aspergillus* spp. toxigênico em arroz. *Ciencia Tecnol Alime*, Campinas, **30**(1), 60–62.
- Health Protection Agency [HPA]. (2009). Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods Placed on the Market. Acedido em 2 de outubro de 2019 em: http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1259151921557
- Hoel, S., Mehli, L., Bruheim, T., Vadstein, O., & Jakobsen A. N. (2015). Assessment of Microbiological Quality of Retail Fresh Sushi from Selected Sources in Norway. *J Food Prot*, **78**(5), 977–982.
- Hoel, S., Jakobsen, A., & Vadstein, O. (2017). Effects of storage temperature on bacterial growth

- rates and community structure in fresh retail sushi. *J Appl Microbiol*, **123**(3), 698-709.
- Hoel, S., Vadstein, O., & Jakobsen, A. N. (2018). Growth of mesophilic *Aeromonas salmonicida* in an experimental model of nigiri sushi during cold storage. *Int J Food Microbiol*, **285**, 1-6.
- Hoff, R. B. (2017). Monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos e no ambiente: Modelo Para Avaliação. *Science And Animal Health*, **5**(3), 195–211.
- Hokama, A., Oshiro, T., Tomisato, K., Nakamatsu, G., Tameda, S., & Fujita, J. (2019). Gastric anisakidosis: an unfavorable taste of Sushi. *Pol Arch of Intern Med*, **129** (7-8), 547–548.
- Huss, H. H. (1994). Assurance of seafood quality. Technological Laboratory Ministry of Fisheries. Denmark. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome, Italy.
- Huss, H. H. (1997). Garantia da qualidade dos produtos da pesca. Food and Agriculture Organization (FAO). Documento Técnico sobre as Pescas nº 334, Roma.
- Huss, H. H., Reilly, A., & Embarek, K. B. P. (2000). Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control*, **11**(2), 149–156.
- Iamanaka, B., Oliveira, I., & Taniwaki, M. (2010). Micotoxinas em alimentos. *Instituto de Tecnologia de Alimentos*, São Paulo, **7**, 138–161.
- Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge [INSA]. (2019). Interpretação de resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de preparação e distribuição alimentar: Valores-guia. Acedido em 5 de dezembro de 2019 em: <http://www.insa.min-saude.pt/interpretacao-de-resultados-de-ensaios-microbiologicos-valores-guia-insa-2019/>.
- ISO 7218 (2007/ Amd 1 2013) Microbiology of food and animal feeding stuffs. General requirements and guidance of microbiological examinations, International Organization for Standardization, Geneve, Suíça.
- ISO 6579-1 (2017) Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*, International Organization for Standardization, Geneve, Suíça.
- ISO 11290-1 (2017) Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp., International Organization for Standardization, Geneve, Suíça.
- ISO 21872-1 (2017) Microbiology of the food chain. Horizontal method for the determination of *Vibrio* spp., International Organization for Standardization, Geneve, Suíça.

- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). *Modern Food Microbiology*, (7ª ed., pp. 39-59; 476-477) Nova Iorque, EUA: Springer.
- Kato, H. C. de A., Oliveira, L. de S., Maciel, É. da S., & De Freitas, A. A. (2016). A cozinha de fusão encontra o rio: peixes nativos amazônicos como alternativa para a culinária japonesa. *Applied Tourism*, **1**(2), 97-114.
- Kim, N. H., Yun, A. -R., & Rhee, M. S. (2011). Prevalence and classification of toxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from refrigerated ready-to-eat foods (sushi, kimbab and California rolls) in Korea. *J Appl Microbiol*, **111**, 1456-1464.
- Kotiranta, A., Lounatmaa, K., & Haapasalo, M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect*, **2**(2), 189–198.
- Lee, C. J., & Heacock, H. (2014). Safety and pH Measurements of Sushi Rice in Japanese Restaurants in Burnaby BC, Canada. Acedido em 2 de dezembro de 2019 em: <http://www.ncceh.ca/sites/default/files/BCIT-Lee-2014.pdf>
- Leisner, J. J., Lund, T. B., Frandsen, E. A., Andersen, N. B. E., Fredslund, L., Nguyen, V. P. T., & Kristiansen, T. (2014). What consumers expect from food control and what they get – A case study of the microbial quality of sushi bars in Denmark. *Food Control*, **45**, 76–80.
- Leyral, G., & Vierling, É. (Eds.). (2007). Microbiologie et toxicologie des aliments: *Infections alimentaires d'origine microbienne*. (4ª Ed., pp. 99-132). Bordeaux: Doin, éditeurs.
- Liang, W., Pan, Y., Cheng, H., Li, T., Yu, P. H., & Chan, S. (2016). The microbiological quality of take-away raw salmon finger sushi sold in Hong Kong. *Food Control*, **69**, 45–50.
- Li, H., Stegger, M., Dalsgaard, A., & Leisner, J. J. (2019). Bacterial content and characterization of antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in Danish sushi products and association with food inspector rankings. *Int J Food Microbiol*, 108244.
- Manning, B. B. (2010). Mycotoxins in aquaculture feeds. *Southern Regional Aquaculture Center [SRAC]*, **5002**, 1–4.
- Marôco, J. (2014). *Análise Estatística: Com o SPSS Statistics* (6ª ed.). Lisboa: Sílabo.
- Martins, F. (2006). Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de preparações (sushi e sashimi) à base de pescado cru servidos em bufês na cidade de São Paulo. (Dissertação de mestrado). Universidade de São Paulo. Acedido em 20 de junho de 2019 em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6135/tde-13122006-141234/publico/Dissertacao_MartinsFO.pdf
- Masson, M., & Pinto, R. (1998). Perigos potenciais associados ao consumo de alimentos derivados de peixe cru. *B.CEPPA*, Curitiba, **16**(1), 71–84.

- McSwane, D., Rue, N., & Linton, R. (Eds.). (2000). Hazards to Food Safety: *Essentials of food safety and sanitation* (2^a ed., pp. 25-69). New Jersey: Prentice-Hall, Inc.
- Melo, M., Holanda, M., Martins, N., & Rodrigues, R. (2014). Ocorrência de helmintos em sushis e sashimis comercializados em supermercados de Fortaleza, Ceará. *Nutrivisa*, **1**(3), 11–16.
- Mendes, D. (2010). Avaliação da qualidade microbiológica de sushi, pronto para consumo, comercializado na cidade de Lisboa. (Dissertação de mestrado). Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Almada.
- Mercogliano, R., & Santonicola, S. (2019). Scombroid fish poisoning: Factors influencing the production of histamine in tuna supply chain. A review. *LWT*, **114**, 108374.
- Merck (Ed.). (2010). *Microbiology Manual* (12th ed.).
- Miguéis, S., Santos, C., Saraiva, C., & Esteves, A. (2014). Evaluation of ready to eat sashimi in northern Portugal restaurants. *Food Control*, **47**, 32–36.
- Miranda, M. M. M., Moreano, M. R., & Ocampo, G. T. (2018). Occurrence, dietary exposure and risk assessment of aflatoxins in arepa, bread and rice. *Food Control*, **98**, 359–366.
- Montville, T. J., Mathews, K., & Kniel, K. (2012). Food Microbiology an Introduction, (7^a ed., pp. 39-59) Nova Iorque, EUA: Springer.
- Morgano, M. A., Gomes, P. C., Mantovani, D. M. B., Perrone, A. A. M., & Santos, T. F. (2005). Níveis de mercúrio total em peixes de água doce de pisciculturas paulistas. *Ciencia Tecnol Alime*, Campinas, **25**(2), 250–253.
- Moura, A. (2015). Avaliação Microbiológica de Refeições de Sashimi de Restaurantes da Região Norte de Portugal Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. (Dissertação de mestrado). Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro, Vila Real. Acedido em 15 de junho de 2019 em: <https://docplayer.com.br/32534467-Avaliacao-microbiologica-de-refeicoes-de-sashimi-de-restaurantes-da-regiao-norte-de-portugal.html>
- Muscolino, D., Giarratana, F., Beninati, C., Tornambene, A., Panebianco, A., Ziino, G., et. al., (2014). Hygienic-sanitary evaluation of sushi and sashimi sold in Messina and Catania, Italy. *Ital J Food Saf*, **3**(1701), 134-136.
- Nascimento, S., Nóbrega, R., Ventura, A., & Callou, K. (2019). Preparações de Temakis adaptados à culinária brasileira: alimentos nutricionalmente adequados?. *Braz J Hea Rev*. Curitiba, **2**(1), 359–370.
- Nawa, Y., Hatz, C., & Blum, J. (2005). Sushi Delights and Parasites: The Risk of Fishborne and Foodborne Parasitic Zoonoses in Asia. *Clin Infect Dis*, **41**, 1297–1303.

- Novais, M. R. (1998). Microbiologia dos Alimentos. In Ferreira, W. F. C., & de Sousa, J. C. F. (Coord.), *Microbiologia* (Volume I, pp. 297-308). Porto: Lidel, edições técnicas.
- Nunes, M. L., Bandarra, N. M., & Batista, I. (2011). Handbook of seafood quality, safety and health applications. In Alasalvar, C., Miyashita, K., Shahidi, F., & Wanasundara, U. (Eds.), *Health benefits associated with seafood consumption*. (cap. 29., pp. 367-370). Acedido em 3 de setembro de 2019 em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781444325546.ch29>
- NP EN ISO/ IEC 17025 (2018) Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração, Instituto Português da Qualidade, Ministério da Economia e Inovação, Lisboa.
- New South Wales Food Authority [NSW Food Authority]. (2007). Food safety guidelines for the preparation and display of sushi. NSW Food Authority, 1-16. Acedido em 7 de junho de 2019 em: http://www.foodauthority.nsw.gov.au/Documents/retail/sushi_preperation_display_guidelines.pdf
- New South Wales Food Authority [NSW Food Authority]. (2008). Report on food handling practices and microbiological quality of sushi in Australia. NSW Food Authority, 1-16. Acedido a 20 de junho de 2019 em: <https://www.foodstandards.gov.au/publications/documents/Microbiological-quality-of-sushi-in-Australia-survey.pdf>
- Oliveira, A., Paula, C., Capalanga, R., Cardoso, M., & Tondo, E. (2010). Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. *Revista Hospital de Clínicas e da Faculdade de Medicina publica*, **30**(3), 279–285.
- Oliver, J. D., & Kapter, J. B. (2007). *Vibrio* Species. In Doyle, M.P & Beauchat, R. (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* (3ª Ed., pp. 343-379). Washington, DC: ASM Press.
- Oxoid, (2011a). Triple Sugar Iron Agar. Acedido em 4 de junho de 2019 em: http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0277&c=UK&lang=EN
- Oxoid, (2011b). Listeria selective agar – Oxford. Acedido em 4 de junho de 2019 em: http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0856&cat=&c=UK&lang=EN
- Oxoid, (2012). Cholera medium TCBS. Acedido em 4 de junho de 2019 em: http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0333&c=UK&lang=EN

- Passos, F., & Reis, M. (2013). Resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal: Revisão. *Pesticidas: R Ecotoxicol e Meio Ambiente*, Curitiba, **23**, 49–58.
- Pimenta, I. (2010). Macroalgas na alimentação humana. (Dissertação de mestrado). Instituto Politécnico De Viana Do Castelo. Acedido em 5 de setembro de 2019 em: http://repositorio.ipvc.pt/bitstream/20.500.11960/2075/1/Isabel_Pimenta.pdf
- Pinheiro, H., Vieira, R., Carvalho, F., Reis, E., Sousa, O., Vieira, G., et. al., (2006). *Salmonella* sp. e coliformes termotolerantes em sushi e sashimi comercializados na cidade de Fortaleza-Ceará. *Bol. Téc. Cient. CEPENE*, **14**(1), 23–31.
- Pinho, J. (2015). Consumo de pescado cru: Inquérito sobre o consumo e a perceção dos riscos. (Relatório final de estágio). Universidade do Porto. Acedido em 5 de setembro de 2019 em: <http://hdl.handle.net/10216/78671>
- Pinto, A. (1996). Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos. *Milenium*, (4), 91–100. Acedido em 7 de julho de 2019 em: <http://hdl.handle.net/10400.19/671>
- Prado, B. G., Iwatani, J. E., Pereira, M. R., Gollucke, A. P. B., & Toledo, L. P. (2014). Pontos críticos de controle na qualidade higiênico-sanitária do preparo de sushis e sashimis no município de São Vicente, São Paulo. *Segurança Alimentar e Nutricional*, Campinas, **21**(1), 359–372.
- Puel, O., Galtier, P., & Oswald, I. P. (2010). Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins*, **2**(4), 613–631.
- Ray, B. (2005). Important Facts in Foodborne Diseases. In *Fundamental Food Microbiology* (2^a Ed., pp. 305–321). Boca Raton, USA: CRC Press.
- Regulamento (CE) n.º 852/2004 de 29 de abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios, *Jornal Oficial da União Europeia*, L139/1, Parlamento Europeu e do Conselho, Estrasburgo.
- Regulamento (CE) n.º 853/2004 de 29 de abril de 2004, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal, *Jornal Oficial da União Europeia*, L139/55, Parlamento Europeu e do Conselho, Estrasburgo.
- Regulamento (CE) n.º 2073/2005 de 15 de novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, *Jornal Oficial da União Europeia*, L338/1, Comissão Europeia, Bruxelas.
- Rodrigues, C., Guiné, R., & Correia, P. (2015). *Manual de Segurança Alimentar – Da Origem ao Consumo*. Porto: Publindústria.
- Rohman, A., Helmiyati, S., Hapsari, M., & Setyaningrum, D. L. (2014). Rice in health and

- nutrition. *International Food Research Journal*, **21**(1), 13–24.
- Santos, A. A., Simões, G. T. N., Cruz, M. M., Ferreira, N. S. S., Lima, R. T. C., & Tunon, G. I. L. (2012). Avaliação da qualidade microbiológica de sushi comercializado em restaurantes de Aracaju, Sergipe. *Scientia Plena*, **8**(3), 1-5.
- Santos, M. I., Cavaco, A., Gouveia, J., Novais, M. R., Nogueira, P. J., Pedroso, L., & Ferreira, M.A.S.S.A. (2012). Evaluation of minimally processed salads commercialized in Portugal. *Food Control*, **23**, 275-281.
- Sartori, A. G. de O., & Amancio, R. D. (2012). Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. *Segurança Alimentar e Nutricional*, Campinas, **19**(2), 83-93. Acedido em 5 de junho de 2019 em: <https://doi.org/10.20396/san.v19i2.8634613>
- Satin, M. (2008). *Food alert! The ultimate sourcebook for food safety* (2ª ed., pp. 35-39). New York: Facts on File.
- Sato, R. (2013). Características microbiológicas de sushis adquiridos em estabelecimentos que comercializam comida japonesa. (Dissertação de mestrado). Universidade Estadual Paulista, São Paulo. Acedido em 5 de agosto de 2019 em: <http://hdl.handle.net/11449/94612>
- Sidhu, K. S. (2003). Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil. *Regul Toxicol Pharmacol*, **38**, 336–344.
- Silva, V., Nunes, J., Gomes, A., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Pereira, J. E., et. al., (2019). Detection of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains: Can fish commonly used in raw preparations such as sushi and sashimi constitute a public health problem?. *J Food Prot*, **82**(7), 1130–1134.
- Smith, A. G., & Gangolli, S. D. (2002). Organochlorine chemicals in seafood: Occurrence and health concerns. *Food and Chemical Toxicology*, **40**(6), 767–779.
- Sobral, M. M. C., Cunha, S. C., Faria, M. A., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2018). Domestic cooking of muscle foods: Impact on composition of nutrients and contaminants. *Compr Rev Food Sci F*, **17**, 309–333.
- Sousa, M., Amaral, R., & Oliveira, B. (2012). *Revista Nutricías*, **15**, 31–33. Acedido em 19 de julho de 2019 em: <http://www.scielo.mec.pt/pdf/nut/n15/n15a08.pdf>
- Sousa, C. P. (2006). Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. *Revista APS*, **9**(1), 83–88.
- Souza, A., Calixto, F., Mesquita, E., Packness, M., & Azeredo, D. (2015). Histamina e rastreamento de pescado: revisão de literatura. *Arq Inst Biol*, **82**, 1–11.

- Swanson, D., Block, R., & Mousa, S. A. (2012). Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA : Health Benefits Throughout Life. *Adv Nutr*, **3**, 1–7. Acedido em 6 de abril de 2019 em: <https://doi.org/10.3945/an.111.000893>
- Swaminatham, B., Cabanes, D., Zhang, W., & Cossart, P. (2007). *Listeria monocytogenes*. In Doyle, M. P., & Beauchat, R. (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* (3^a Ed., pp. 457-491). Washington, DC: ASM Press.
- Tirloni, E., Bernardi, C., Gandolfi, G., Cattaneo, P., & Stella, S. (2017). What Happens to the Microflora of Retail Sushi in the Warm Season?. *J Food Nutr Res*, **5**(2), 95-100.
- Vallandro, M. J., Campos, T., Paim, D., Cardoso, M., & Kindlein, L. (2011). Avaliação da qualidade microbiológica de sashimis à base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, **70**(2), 144-150.
- Vale, P. (2011). Biotoxinas emergentes em águas europeias e novos riscos para a saúde pública. *Rev Port Sau Pub*, **29**(1), 77–87.
- Veiga, A., Lopes, A., Carrilho, E., Silva, L., Dias, M. B., Seabra, M. J., et. al., (2009). Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em Portugal. *Autoridade de Segurança Alimentar e Económica*, 1-330. Acedido em 7 de julho de 2019 em: <http://www.asae.gov.pt/pesquisa.aspx>
- Vidaček, S., & Janči, T. (2016). Safety of Fish Products. *Regulating Safety of Traditional and Ethnic Foods*, Croatia, 79–97.
- Viegas, S. J. (2010). Alterações do estado de saúde associadas à alimentação - Contaminação microbiológica dos alimentos. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Acedido em 8 de julho de 2019 em: <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/14>
- Willshaw, G. A., Cheasty, T., & Smith, H. R. (2000). *Escherichia coli*. In Lund, B. M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (Eds.) *The Microbiological Safety and Quality of Food*, (Vol II., pp. 1136-1177). Gaithersburg, EUA: Aspen Publication
- World Health Organization [WHO]. (2003). Fruit and vegetable promotion initiative - report of the meeting, Geneva.
- World Health Organization [WHO]. (2008). Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control. Geneva. Acedido em 18 de julho de 2019 em: http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/outbreak_guidelines.pdf
- World Health Organization [WHO]. (2017). Stage One Booklet - Strengthening surveillance of and response to foodborne diseases, investigating foodborne disease outbreaks. Geneva.

Acedido em 21 de julho de 2019 em:

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259475/9789241513234-eng.pdf;jsessionid=B01DE1EFF4692FF7EFDDE4113A3536C4?sequence=1>

Yamamoto, K., & Hicks, R.W. (2005). Tentação culinária: Sushi. Lisboa: Lisma.