

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM HIGIENE VETERINÁRIA E  
PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM  
ANIMAL

ANDRÉ LUIZ MEDEIROS DE SOUZA

AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA E SENSORIAL DA CARNE  
DE CAÇÃO ANEQUIM (*Isurus oxyrinchus*)  
(ELASMOBRANCHII: LAMNIDAE) COMERCIALIZADA NO  
MUNICÍPIO DE NITERÓI, RIO DE JANEIRO, BRASIL.

UNIVERSIDADE  
FEDERAL  
FLUMINENSE

NITERÓI  
2013

ANDRÉ LUIZ MEDEIROS DE SOUZA

AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA E SENSORIAL DA CARNE DE  
CAÇÃO ANEQUIM (*Isurus oxyrinchus*) (ELASMOBRANCHII:  
LAMNIDAE) COMERCIALIZADA NO MUNICÍPIO DE NITERÓI, RIO DE  
JANEIRO, BRASIL.

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária da Universidade Federal  
Fluminense. Área de Concentração: Higiene  
Veterinária e Processamento Tecnológico de  
Produtos de Origem Animal.

Orientadora: ELIANA DE FÁTIMA MARQUES DE MESQUITA

Co-orientador: ROBSON MAIA FRANCO

Co-orientadora: SHIZUKO KAJISHIMA

Niterói  
2013

ANDRÉ LUIZ MEDEIROS DE SOUZA

AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA E SENSORIAL DA CARNE DE  
CAÇÃO ANEQUIM (*Isurus oxyrinchus*) (ELASMOBRANCHII:  
LAMNIDAE) COMERCIALIZADA NO MUNICÍPIO DE NITERÓI, RIO DE  
JANEIRO, BRASIL.

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária da Universidade Federal  
Fluminense. Área de Concentração: Higiene  
Veterinária e Processamento Tecnológico de  
Produtos de Origem Animal.

Aprovado em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2013.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana de Fátima Marques de Mesquita - UFF  
Orientadora

---

Prof. Dr. Robson Maia Franco - UFF

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sílvia Conceição Reis Pereira Mello - UNISUAM

---

Prof. Dr. Zander Barreto Miranda - UFF

---

Prof<sup>a</sup>. Shizuko Kajishima - UFF  
Suplente

Niterói  
2013

“Eu que já não sou assim muito de ganhar,  
junto as mãos ao meu redor.  
Faço o melhor que sou capaz  
só pra viver em paz.”

Los Hermanos – O vencedor

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades e vivências que obtive até o presente dia, o que me fortaleceu e me fez aprender com os desafios e provações durante a minha vida.

Aos meus pais, Vanda Medeiros de Campos e José Carlos Carneiro de Souza, e irmãs, Maria Angélica e Maria Elisa Carvalho de Souza e Ana Paula Souza, por sempre me darem forças e estarem presentes, me incentivando e apoiando em minhas escolhas. Em especial para minha avó, Rosalina Teixeira de Medeiros, que sempre foi e sempre será uma parte de mim, o meu grande amor.

Ao meu companheiro de vida, Hugo Coelho, por todo o amor, incentivo e amizade. Por ser minha força de vontade e trazer alegrias e sorrisos aos meus dias.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eliana Mesquita, por todo o suporte oferecido, todos os cuidados e ensinamentos compartilhados, por sempre estar ao meu lado quando necessário e por ser essa “mãezona”. Sua orientação realmente me fez crescer pessoalmente e profissionalmente.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Robson Maia Franco, que é um excelente profissional e orientador, um ótimo microbiologista, disposto a compartilhar com todos seus aprendizados.

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. MSc Shizuko Kajishima, uma pessoa exemplar, de grande coração, que me acolheu e esteve ao meu lado nesse percurso.

À toda equipe dos Laboratórios de Microbiologia da Faculdade de Veterinária e de Análise Sensorial da Faculdade de Nutrição da UFF, especialmente para Bianca Medina, Eduardo Bruno Nogueira, Juliana Gerth, Marcelle Allencar e Vinícius Alves, pelo suporte oferecido e amizade construída.

A todos os membros do QG, especialmente para os amigos médicos veterinários Cristianne Platte, Diego Ribeiro, Flávia Calixto e Mariana Packness, pela força e companheirismo nas horas mais complicadas.

Aos amigos da pós-graduação em Medicina Veterinária, em especial à Janaína Ribeiro, Marta Xavier e Michelle Nana, por trazerem alegria para o meu dia-a-dia.

Aos meus amigos, que são como uma família pra mim, pela paciência, apoio e companheirismo, especialmente para Bruna Savaget, Fausto Saito, Flávia Paulo, Isabella Pacheco, Júlia Teykal, Luana Carvalho, Ludmyla Almeida, Maíra Cardoso, Marina Seixas e Michael Knecht. Sem eles, eu nada seria.

Ao meus animais, por serem os melhores amigos dos humanos, meus maiores amores, estando presentes da forma mais pura e sincera possível.

Ao Prof. Renato Clapp, pela disponibilização do Laboratório de Aquicultura da UFF para meu uso.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, em especial aos secretários Drausio Ferreira, Mariana Ferreira e André Veiga.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior, pelo auxílio e incentivo através de bolsa de estudo.

## RESUMO

Os consumidores buscam produtos com qualidade e diversificados. É de suma importância promover o controle de qualidade de alimentos, em relação a suas características bacteriológicas, oferecendo desta forma alimentos inócuos à população. No estado do Rio de Janeiro, o pescado, um produto com curto prazo comercial, é altamente procurado e consumido. E neste grupo encontra-se o filé de cação, principalmente da espécie *Isurus oxyrinchus* (Elasmobranchii: Lamnidae), popularmente conhecido como cação Anequim. A carne do cação, além de ser um produto diferenciado e aceito, possui custo relativamente baixo, e por isso, encontra-se em 5º lugar dentre os peixes importados vendidos nos supermercados do Rio de Janeiro. Atualmente, não há legislação vigente que promova um padrão de identidade e qualidade deste alimento. Utilizando 17 amostras de carne de cação fresca, provenientes de mercados, localizados em Niterói, na cidade do Rio de Janeiro, foram realizadas análises bacteriológicas (Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e bactérias heterotróficas psicotróficas, *Salmonella* spp., Coliformes termotolerantes, *Vibrio parahaemolyticus* e *Staphylococcus* coagulase positiva) e sensorial (testes de preferência e aceitação) para a verificação da qualidade destas, e posteriormente, feita a análise estatística dos resultados obtidos nos mesmos. Nos resultados bacteriológicos, foram obtidos não conformidades em amostras estudadas quanto à pesquisa de *Salmonella* spp. e enumeração de *Vibrio parahaemolyticus*. A carne de filé de cação foi aceita pelos provadores, comprovando-se sua comercialização com frequência em Niterói, Rio de Janeiro. Objetivou-se neste trabalho a avaliação das condições higiênico-sanitárias, promovendo a avaliação bacteriológica e sensorial, do filé de cação Anequim (*I. oxyrinchus*), comercializado no município de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.

Palavras-chave: Cação Anequim. Pescado. Rio de Janeiro. Análises. Qualidade.

## ABSTRACT

Consumers are looking for products with quality and diversity. It is extremely important to promote quality control of food concerning to their microbiological characteristics and offering safe products to the population. In the state of Rio de Janeiro, a short-term shelf life product as fish is highly bought and consumed. And in this group is the shark fillet, especially the species *Isurus oxyrinchus* (Elasmobranchii: Lamnidae), popularly known as Shortfin Mako Shark. The meat of this type of shark is a distinguished and accepted product and has relatively low cost. That is why it's in the 5<sup>th</sup> place of the ranking among the imported fishes sold in Rio de Janeiro state supermarkets. Nowadays there is no legislation that can promote an identity standard and the quality of this product. The bacteriological (Heterotrophic aerobic mesophilic bacteria and heterotrophic psychrotrophic bacteria, *Salmonella* spp., Thermophilic coliforms, *Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus* coagulase positive) and sensorial analysis (test of acceptability and preference) of 17 samples of shark fresh fillet from markets of Niterói city was carried out, and soon after the statistical analysis was done. The bacteriological results showed nonconformities for the search of *Salmonella* spp. and enumeration of *Vibrio parahaemolyticus*. The vast majority of the shark fillet was accepted by the panels, confirming its consumer preference and high commercialization. The objective of this work was to analyse the sanitary and hygienic conditions, through the bacteriological and sensorial evaluation of Shortfin Mako Shark fillet (*I. oxyrinchus*) sold in Niterói city, Rio de Janeiro state, Brazil.

Key words: Shortfin Mako Shark meat. Fish. Trade market. Sensory Analysis. Quality.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Quadro 1 Padrões bacteriológicos estipulados para CBHAM, CBHAP, coliformes termotolerantes e *S. coagulase positiva* em pescado, p. 35
- Quadro 2 Padrões bacteriológicos estipulados para *Salmonella* spp. e *V. parahaemolyticus* em pescado, p. 35
- Quadro 3 Diferenças entre peixes ósseos e cartilagosos, p. 36
- Fig.1 Um exemplar de Cação Anequim, p. 40
- Fig.2 Distribuição geográfica do Cação Anequim, p. 41
- Fig.3 Captura global de *Isurus oxyrinchus.*, p. 44
- Fig. 4 Comercialização de uma das amostras sobre gelo em mercado, 24/07/12, p. 48
- Fig. 5 Retirada asséptica de 75 g de amostra, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 07/08/12, p. 49
- Fig. 6 Placa ideal para CBHAM, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 17/07/12, p. 51
- Fig. 7 Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias psicotróficas, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 22/08/12, p. 52
- Fig. 8 Colônias típicas de *Salmonella* spp. em meio BPLS (A), meio Rambach (B) e meio Hecktoen (C), no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 24/08/12, p. 53
- Fig. 9 Tubo positivo para *Salmonella* spp. em meio TSI, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 28/07/12, p. 54
- Fig.10 Prova da fenilalanina positiva à direita, e negativa à esquerda, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 28/08/12, p. 55
- Fig. 11 Prova de soroagultinação para *Salmonella* spp. com resultado positivo, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 21/08/12, p. 56
- Fig. 12 Colônias típicas de coliformes em placa com meio VRBL, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 25/07/12, p. 57
- Fig. 13 Tubos com meio GSTB com turvação, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 11/07/12, p. 58
- Fig. 14 Realização de estriamento em placa contendo TCBS, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 22/08/12, p. 59

Fig. 15 Colônias típicas de *V. parahaemolyticus* em placa com meio TCBS, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 26/07/12, p. 60

Fig. 16 Tubos com meio TSI, com base ácida e bisel alcalino, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 17/07/12, p. 61

Fig. 17 Esfregaço corado pelo método de Gram, com bastonetes retos e curvos Gram-negativos, oriundo do meio TSI, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 27/08/12, p. 61

Fig. 18 Aparecimento da cor azul em tiras de prova de oxidase, com resultado positivo para *V. parahaemolyticus*, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 10/10/12, p. 62

Fig. 19 Tubos com meio O/F glicose sal 3%, sendo os dois da direita antes da inoculação, e os dois da esquerda após incubação, com a viragem de cor, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 10/10/12, p. 63

Fig. 20 Tubo com ágar motilidade sal 3%, com crescimento difuso ao redor da picada, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 10/10/12, p. 64

Quadro 4 Resultados característicos de *V. parahaemolyticus* nas provas adicionais de identificação, p. 66

Fig. 21 Colônia típica de *S. coagulase* positiva em placa com meio Baird-Parker, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 23/08/12, p. 67

Fig. 22 Resultado positivo de três cruces na prova da coagulase, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 18/08/12, p. 68

Fig. 23 Formação de borbulhas em prova da catalase positiva, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 25/08/12, p. 69

Fig. 24 Termo de consentimento livre e esclarecido. Material cedido pela Prof<sup>a</sup>. Shuzuko Kajishima, UFF, 2012, p. 70

Fig. 25 (A) Amostra 15, com coloração característica da carne do cação; (B) Amostra 14, com coloração não condizente à carne de cação, Laboratório de Análise Sensorial, UFF, 11/12/12, p. 71

Fig. 26 Filé de cação lavado antes do corte, Laboratório de Análise Sensorial, UFF, 11/12/12, p. 72

Fig. 27 Filé de cação cortado uniformemente, pesando aproximadamente 20 g cada, Laboratório de Análise Sensorial, UFF, 11/12/12, p. 72

Fig. 28 Ficha técnica de preparação. Material cedido pela Prof<sup>a</sup>. Shuzuko Kajishima, UFF, 2012, p. 73

- Fig. 29 Apresentação da amostra, oferecida juntamente com copo de água mineral e biscoito tipo água, Laboratório de Análise Sensorial, UFF, 2012, p. 74
- Fig. 30 Ficha de teste de preferência e aceitação. Material cedido pela Prof<sup>a</sup>. Shuzuko Kajishima, UFF, 2012, p. 75
- Fig. 31 Distribuição da CBHAM pelas amostras em diagrama de caixa (“block spot”), p. 79
- Fig. 32 Distribuição da CBHAP pelas amostras em diagrama de caixa (“block spot”), p. 79
- Fig. 33 Gráfico constando as amostras que apresentaram resultado positivo para *Salmonella* spp., p. 81
- Fig. 34 Distribuição da contagem de coliformes em diagrama de caixa (“block spot”). As amostras 9 e 12 encontram-se fora do padrão estipulado, p. 84
- Fig.35 Distribuição da contagem de *Vibrio* spp. em diagrama de caixa (“block spot”), p. 87
- Fig. 36 Gráfico constando os resultados referentes a *V. parahaemolyticus*, p. 88
- Fig. 37 Distribuição da contagem de *Staphylococcus* spp. em diagrama de caixa, p. 91
- Fig. 38 Gráfico constando as amostras positivas para *S. coagulase positiva*, p. 91
- Fig. 39 Gráfico da intenção de compra da amostra 7, p. 95
- Fig. 40 Gráfico da intenção de compra da amostra 9, p. 96

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Resultados obtidos em UFC/g na CBHAM e CBHAP, p. 78

TABELA 2 – Resultados obtidos em UFC/g em ágar VRBL, p. 83

TABELA 3 – Número Mais Provável de *Vibrio* spp./g de amostra, p. 86

TABELA 4 – Contagem de *Staphylococcus* spp. (UFC/g de amostra), p. 90

TABELA 5 – Média dos atributos cor, aroma, sabor, textura das amostras, e média geral do primeiro dia de análise, p. 93

TABELA 6 – Média de atributos cor, aroma, sabor, textura das amostras, e média geral do primeiro dia de análise, p. 94

TABELA 7 – Percentagem de aceitação e rejeição do file de cação, p. 94

TABELA 8 – Percentagem da intenção de compra do file de cação, p. 95

TABELA 9 – Relação dos resultados bacteriológicos e sensorial, p. 98

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	“Analyses of variance”
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Ágar Padrão para Contagem
BHI	“Brain Heart Infusion”
BPLS	Ágar Bile Peptona Lactose-Sacarose
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBHAM	Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas
CBHAP	Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas
CEP	Código de Endereçamento Postal
cód.	Código
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
EC	Caldo <i>Escherichia coli</i>
et al.	E outros
FAO	“Food and Agriculture Organization”
FDA	“Food and Drug Administration”
FEHD	“Food and Environmental Hygiene Department”
g	Grama
GSTB	“Glucose Salt Teepol Broth”
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICCAT	“International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas”
ICMSF	“International Commission on Microbiological Specifications for Foods”
IN	Instrução Normativa
kg	Quilograma
kGy	Quilogray
log	Logarítmica
mcg	Micrograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro

NaCl	Cloreto de sódio
NH <sub>3</sub>	Amônia
NMP	Número Mais Provável
NMP/g	Número Mais Provável por grama
NOAA	“National Oceanic and Atmospheric Administration”
O/F	Oxidação e Fermentação
OTMA	Óxido de trimetilamina
pH	Potencial hidrogeniônico
POA	Produtos de Origem Animal
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
R\$	Real
SBEEL	Sociedade Brasileira para o Estudo de Elasmobrânquios
spp	Espécies
t.	Tonelada
TCBS	Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose
TDH	Hemolisina termoestável direta
TMA	Trimetilamina
TRH	Hemolisina termoestável relacionada com TDH
TSI	Ágar “Triple Sugar Iron”
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFC/g	Unidade Formadora de Colônia por grama
UFF	Universidade Federal Fluminense
UNISUAM	Centro Universitário Augusto Motta
U\$	Dólar
VRBL	Ágar “Violet Red Bile with Lactose”
WHO	World Health Organization
°C	Grau Celsius
α	Nível de significância
Δ	Diferença das médias
%	Percentual
®	Marca registrada
≥	Igual ou maior

<

Menor

±

Mais ou menos

## SUMÁRIO

**RESUMO**, p. 7

**ABSTRACT**, p. 8

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**, p. 9

**LISTA DE TABELAS**, p. 12

**LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS**, p. 13

**1 INTRODUÇÃO**, p. 18

**2 REVISÃO DE LITERATURA**, p. 19

2.1 O PESCADO E SUA RÁPIDA DETERIORAÇÃO, p. 19

2.2 CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO PESCADO, p. 21

2.2.1 **Bactérias mesófilas e psicotróficas**, p. 23

2.2.2 ***Salmonella spp.***, p. 25

2.2.3 **Coliformes termotolerantes**, p. 27

2.2.4 ***Vibrio parahaemolyticus***, p. 30

2.2.5 ***Staphylococcus coagulase positiva***, p. 32

2.2.6 **Legislações nacionais e internacionais**, p. 34

2.3 A BIOLOGIA DO CAÇÃO, p. 36

2.4 DADOS DE CAPTURA E COMERCIALIZAÇÃO DO CAÇÃO, p. 37

2.5 CAÇÃO ANEQUIM (*Isurus oxyrinchus*), p. 40

**3 MATERIAL E MÉTODOS**, p. 47

3.1 MÉTODOS, p. 47

3.1.1 **Coleta e transporte**, p. 47

3.1.2 **Análises bacteriológicas**, p. 48

3.1.2.1 Preparo das amostras, p. 49

3.1.2.2 Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM), p. 50

3.1.2.3 Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas (CBHAP), p.

51

3.1.2.4 Pesquisa de *Salmonella spp.*, p. 52

3.1.2.5 Contagem de coliformes termotolerantes, p. 56



3.1.2.6 Número Mais Provável de *Vibrio parahaemolyticus*, p. 58

3.1.2.7 Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, p. 66

3.1.3 **Análise sensorial**, p. 69

3.1.3.1 Caracterização dos provadores, p. 70

3.1.3.2 Preparo das amostras, p. 71

3.1.3.3 Condições dos testes, p. 73

3.1.3.4 Testes de aceitação e preferência, p. 74

3.1.4 **Análise estatística**, p. 76

4 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**, p. 77

4.1 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS, p. 77

4.1.1 **Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas e Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas**, p. 78

4.1.2 ***Salmonella* spp.**, p. 81

4.1.3 **Coliformes termotolerantes**, p. 82

4.1.4 ***Vibrio parahaemolyticus***, p. 86

4.1.5 ***Staphylococcus* coagulase positiva**, p. 90

4.2 ANÁLISE SENSORIAL, p. 92

4.3 RELAÇÃO ENTRE RESULTADOS BACTERIOLÓGICOS E SENSORIAIS, p. 97

5 **CONCLUSÃO**, p. 100

6 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**, p. 101

## 1 INTRODUÇÃO

A comercialização do pescado encontra-se em aumento significativo. É um produto de origem animal rico em nutrientes e bem aceito pelos consumidores. Porém, tem alta susceptibilidade por características próprias, do local de captura e do meio onde é comercializado, iniciando assim facilmente o processo de deterioração.

Entre os animais denominados como pescado, encontra-se o cação, que atualmente tem o filé bastante procurado em pontos de comércio, por ser um produto diferente, de boa qualidade, além de ter custo relativamente baixo para alguns segmentos da população, características que atraem os consumidores.

No estado do Rio de Janeiro, uma das espécies mais encontradas é o cação Anequim (*Isurus oxyrinchus*), um tubarão de grande porte muito comum em águas do Oceano Atlântico com temperaturas acima de 16°C.

Desde o início da pesca de elasmobrânquios oceânicos, é capturado facilmente em todas as regiões brasileiras, principalmente nas regiões Sul e Sudeste, onde, em 2007, foi a segunda espécie de tubarão mais capturada na pesca de espinhel de superfície.

A espécie é considerada uma das melhores para uso na alimentação humana. Além do aproveitamento comercial da carne, as barbatanas, dentes e cartilagem possuem valor agregado.

Objetivou-se no presente trabalho avaliar as condições higiênico-sanitárias, promovendo avaliação bacteriológica e sensorial, da carne de cação Anequim [*Isurus oxyrinchus* (Rafinesque, 1809)] (Elasmobranchii: Lamnidae), comercializado no município de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil, com intuito de fornecer subsídios para implantar padrão de identidade e qualidade do filé junto aos órgãos oficiais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir são abordados itens para um maior entendimento a respeito do pescado e sua rápida deterioração, sua contaminação microbiológica, a biologia do cação, dados sobre sua captura e comercialização e a espécie em questão, conhecida popularmente como cação Anequim.

### 2.1 O PESCADO E SUA RÁPIDA DETERIORAÇÃO

A denominação genérica "pescado" compreende os peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, quelônios e mamíferos de água doce ou salgada, usados na alimentação humana. A denominação "fresco" se refere ao "pescado dado ao consumo sem ter sofrido qualquer processo de conservação, a não ser a ação do gelo" (BRASIL, 1997).

O pescado é, desde a antiguidade, uma importante fonte de nutrientes, assim como a pesca, uma atividade econômica promotora de benefícios sociais para as populações humanas em todo o mundo. Além de ser rico em proteínas, o pescado possui também todos os aminoácidos essenciais ao crescimento e à manutenção do organismo humano, aliado à presença de elementos minerais necessários às inúmeras funções orgânicas (LIRA et al., 2001).

Após a captura, o pescado sofre o processo gradual de deterioração, o qual é natural ao *post-mortem*. Porém, por diversos fatores, é um alimento altamente perecível, sendo o mais suscetível ao processo de deterioração dentre os produtos de origem animal. Segundo Leitão et al. (1988), em iguais condições de armazenamento, a carne do pescado é deteriorado mais rapidamente que a carne de mamíferos.

O pescado é facilmente deteriorado por características próprias, como pH próximo da neutralidade, o que facilita o crescimento microbiano, ação de enzimas autolíticas, elevada atividade de água, teor de nutrientes facilmente utilizáveis por microrganismos e alta atividade metabólica da microbiota que o acompanha.

Constitui-se ainda como fator de relevância que a maioria da gordura dos peixes mostra maior susceptibilidade à deterioração pela rancidez, devido principalmente à elevada insaturação de seus lipídios (ibid.).

A deterioração do pescado instala-se logo após a morte e avança com o tempo. A velocidade de decomposição depende de fatores endógenos e exógenos. Os fatores exógenos são a temperatura, microrganismos, processamento e manipulação. Os endógenos são a composição química e a textura dos tecidos (BARROS, 2003).

Desde o momento em que é retirado do meio aquático, inicia-se uma série de modificações e alterações que podem impedir sua comercialização, tanto como alimento para ser consumido de modo direto quanto como matéria-prima para o beneficiamento (ibid.).

As alterações que mais caracterizam a deterioração do pescado são aquelas relacionadas com o odor e o sabor, e determinam o estado de impróprio para o consumo, pois afetam a condição de comestibilidade (ORDÓÑEZ, 2005).

As alterações químicas associadas ao processo de deterioração do pescado consistem na produção de bases nitrogenadas voláteis, particularmente a trimetilamina (TMA) e amônia ( $\text{NH}_3$ ), a TMA como resultado da redução do óxido de trimetilamina (OTMA), que está presente na maioria dos peixes marinhos e ausentes nos de água doce, e a amônia proveniente de ácidos graxos voláteis, resultantes da disseminação oxidativa de componentes não protéicos do músculo dos peixes, que constitui um excelente substrato para as bactérias (OGAWA; MAIA, 1999).

Outros compostos são formados em menor proporção, contribuindo para alterações observadas durante a deterioração, entre os quais o metil e o etil mercaptanol, diacetil e indol (SILVA et al., 2002).

Além disso, o pescado é um dos alimentos que têm sido associados à doenças de origem alimentar (ibid.).

Em relação à temperatura, o importante é que não seja superior a  $4,4^\circ\text{C}$  durante todo o processo da captura, industrialização e armazenamento, devido ao início da produção do histamina. A origem da histamina ocorre na descarboxilação do aminoácido histidina, através da enzima histidina-descarboxilase. Parte da histamina provém da autólise microbiana, principalmente da família Enterobacteriaceae (RODRIGUES, 2007).

A manipulação do pescado fora das condições ideais de refrigeração permite que bactérias contaminantes consigam se multiplicar e promover a formação da histamina, pois no crescimento, algumas delas produzem a enzima histidina-descarboxilase. A histamina é formada em consequência do abuso do binômio tempo/temperatura em certas espécies de pescado, ou seja, quando o pescado é exposto a altas temperaturas por muito tempo (ibid.).

Importante também observar as características do pescado, que são determinadas pelo exame sensorial, pois são as que mais se alteram no início da decomposição (BRASIL, 1997).

O peixe fresco, conforme o artigo 442 do RIISPOA (ibid.), tem as seguintes características: “superfície do corpo limpa, com relativo brilho metálico; olhos transparentes, brilhantes e salientes, ocupando completamente as órbitas; guelras róseas ou vermelhas, úmidas e brilhantes com odor natural, próprio e suave; ventre roliço, firme, não deixando impressão duradoura à pressão dos dedos; escamas brilhantes, bem aderentes à pele e nadadeiras apresentando certa resistência aos movimentos provocados; carne firme, consistência elástica, de cor própria à espécie; vísceras íntegras, perfeitamente diferenciadas; ânus fechado; e cheiro específico, lembrando o das plantas marinhas”.

Considerando os diversos fatores apontados, tornam-se necessários a aplicação das Boas Práticas de Manipulação alinhadas à outras ferramentas de controle de qualidade em todas as etapas do processamento do pescado (RODRIGUES, 2007).

## 2.2 CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO PESCADO

Doenças veiculadas pelo consumo de pescado são causadas por agentes biológicos, químicos e físicos. Os agentes biológicos são bactérias, vírus e parasitas. As bactérias podem ser associadas ao ambiente aquático habitado pelo pescado, como os vibrios (*Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*), *Listeria* spp., *Clostridium botulinum*, ou associados a contaminação, como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (SANTOS, 2010).

São divididas em intoxicações, como as causadas por *S. aureus* e *C. botulinum*, e infecções, causadas por *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, entre outros. No primeiro caso, o agente causador é uma toxina que contamina o peixe ou é produzida por um agente biológico no animal. A intoxicação irá ocorrer mesmo que o agente produtor esteja morto, desde que previamente tenha produzido quantidade de toxinas suficientes para iniciar o processo. No caso de infecções, o agente causal deve ser ingerido vivo, invadindo mucosas do corpo do hospedeiro (infecção) ou produzindo toxinas (toxi-infecção) (FAO, 2011).

Algumas espécies bacterianas causadoras de doenças fazem parte da microbiota natural do pescado, como *V. parahaemolyticus*, *L. monocytogenes* e *C. botulinum*, porém, de forma geral, a maioria das doenças é causada pela contaminação proveniente do meio ambiente, água e manipuladores (ibid.)

A microbiota do pescado recém-capturado reflete a da água onde vive. Quanto mais poluídas as águas, mais variada será a microbiota. Outro importante fator na contaminação do pescado é seu manejo desde o momento da captura, à bordo e em todas as fases do processamento até seu destino final (GERMANO; GERMANO, 2011).

Microrganismos podem ser encontrados normalmente nas superfícies externas (pele, brânquias e muco) e nos intestinos de peixes vivos e recém-capturados. Teoricamente, os tecidos internos de peixes vivos são considerados esteréis (JAY, 2005).

Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde demonstraram que, no período de 2000 a 2011, ocorreram no Brasil 7.234 surtos de doenças alimentares, sendo 87 em pescado, frutos do mar e processados. Do total de surtos, predominou-se como agentes etiológicos as bactérias *Salmonella* spp. (1.660 surtos), *Staphylococcus aureus* (799 surtos) e *Escherichia coli* (411 surtos), além de outras bactérias com percentuais menos expressivos (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2011).

A seguir, são descritos grupos, gêneros e espécies bacterianas encontrados em pescado, considerados deterioradores e/ou agentes etiológicos de doenças.

### 2.2.1 Bactérias mesófilas e psicotróficas

Bactérias podem ser classificadas quanto à faixa de temperatura de crescimento. As bactérias aeróbias mesófilas se desenvolvem na presença de oxigênio, multiplicam-se sob temperaturas de 20 a 45°C, tendo a temperatura ótima entre 30 a 45°C (SIQUEIRA,1995). Entre os mesófilos, encontra-se a maioria dos microrganismos que comumente degradam os alimentos e que são patogênicos (TORTORA et al., 2003).

O grupo conhecido como psicrotróficos é aquele capaz de se desenvolver em temperaturas abaixo de 7°C. A ação deterioradora das bactérias psicrotróficas se deve principalmente à produção de proteases, lipases e fosfolipases. De forma geral, não sobrevivem aos tratamentos térmicos, porém, muitas de suas enzimas hidrolíticas são termorresistentes (SØRHOUG; STEPANIAK, 1997).

A presença de bactérias mesófilas em grande número em um alimento é indicativa de matéria-prima excessivamente contaminada; limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas; higiene insuficiente na produção ou conservação dos alimentos; condições inadequadas de tempo/temperatura durante a produção ou a conservação dos alimentos, ou uma combinação destas circunstâncias (SIQUEIRA,1995).

Na Resolução RDC nº 12 da ANVISA (BRASIL, 2001), legislação brasileira, são estipulados limites máximos de crescimento de bactérias em diferentes matrizes alimentícias e não contempla padrões para as análises de CBHAM e CBHAP. Para tais, usa-se como referência o limite de  $10^7$  UFC.g<sup>-1</sup> (7 log UFC.g<sup>-1</sup>), estabelecido por legislação internacional (ICMSF, 1986).

Existem fatores que influenciam os resultados da metodologia de Contagem Padrão em Placa: trata-se de meio pouco seletivo, permitindo a multiplicação de microrganismos naturais do pescado, de agentes ambientais e que pouco representam risco sanitário ao produto; células estressadas presentes no produto podem não se multiplicar *in vitro*. Sob essas considerações, esta categoria de análise microbiológica não é decisiva para o reconhecimento do produto próprio ou impróprio para consumo, mas sim indicativa das condições gerais de higiene nas quais o produto foi produzido, obtido e/ou processado (VIEIRA et al., 2004).

Lira et al. (2001), em estudo sobre avaliação de qualidade de pescado comercializado em Maceió, Alagoas, observaram que algumas amostras apresentaram número de mesófilos superior a  $10^6$  UFC/g e não estavam com os caracteres sensoriais alterados, enquanto que outras, com valores inferiores, eram desclassificados na análise sensorial.

Portanto, a contagem de mesófilos está relacionada com a qualidade sanitária dos alimentos, podendo ser utilizada para indicar deficiência no armazenamento em relação ao binômio tempo/temperatura, e a contagem de psicotróficos permite avaliar o grau de deterioração de alimentos refrigerados (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Na literatura, encontram-se comumente estudos de avaliação microbiológica em pescado com as contagens das referidas bactérias. São observados estudos com valores dentro do estipulado, assim como trabalhos onde os valores encontrados foram superiores, conforme descrição abaixo.

Em Portugal, Fontes et al. (2007), verificaram que todas amostras apresentaram contagens de microrganismos psicotróficos abaixo da grandeza  $10^7$  UFC/g, valor estipulado por legislação internacional (ICMSF, 1986), em estudo sobre pescado fresco do comércio varejista.

Em pesquisa de parâmetros de qualidade de pescada (*Macrodon ancylodon*) em São Paulo, Martins (2011) constatou que, em relação aos microrganismos mesófilos, todos elementos amostrais apresentaram resultados dentro dos limites preconizados pelo ICMSF (1986), ao tempo que, quanto à CBHAP, os valores foram superiores em 25% das amostras. O mesmo ocorreu em estudo de Librelato e Shikida (2005) sobre a qualidade do filé da tilápia comercializado em Toledo, Paraná. Na CBHAM, os resultados obtidos foram inferiores à ordem de  $10^6$  UFC/g de amostra, enquanto que os níveis de microrganismos psicotróficos foram superiores aos de mesófilos.

Na avaliação da validade comercial do atum (*Thunnus atlanticus*) resfriado, Andrade (2006) obteve em exemplares sem pele resultados dentro dos limites estipulados por ICMSF (1986) na CBHAM (3,76 log UFC) e CBHAP (5,13 log UFC). Entretanto, nas amostras com pele, os resultados encontrados no dia zero foram de 8 log UFC na CBHAM e 9 log UFC na CBHAP.



Dams et al. (1996), em estudo da qualidade microbiológica da pescadinha (*Cysnoscion striatus*) inteira e em filés em Florianópolis, encontraram valores dentro dos padrões estipulados em análises de CBHAM e CBHAP.

Barreto et al. (2012), na avaliação de pescado comercializado no município de Cruz das Almas, Bahia, obtiveram a quantificação de mesófilos bastante elevada nas amostras frescas, acima dos padrões internacionais. Haida e Muller (1984), em estudo bacteriológico de sardinha (*Sardinella aurita*) *in natura* comercializada em Londrina, Paraná, também relataram quantificações elevadas em CBHAM e CBHAP (HAIDA; MULLER, 1984).

Silva (2010), em estudo de validade comercial de sardinhas verdadeiras (*Sardinella brasilienses*) e sardinhas boca-torta (*Cetengraulis edentulus*) no estado do Rio de Janeiro, obteve inicialmente valores adequados ao estipulado pela legislação internacional (ICMSF, 1986) na CBHAM e CBHAP. Somente foram atingidos valores acima da grandeza de  $10^7$  a partir do 14º dia, em relação às na CBHAM, e 8º dia de estocagem, na CBHAP.

### 2.2.2 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* spp. inclui várias espécies patogênicas para os humanos e os animais. São microrganismos bastonetes Gram-negativos, não esporulados e, embora facultativos, crescem bem em meios comuns na presença de oxigênio livre (PELCZAR et al., 1981).

A bactéria multiplica-se em temperaturas entre 7°C e 46°C, e em quatro horas o alimento contaminado se transforma em alimento infectante. Acima de 60°C por doze minutos, ocorre a destruição bacteriana e, abaixo de 7°C, não ocorre multiplicação do microrganismo (GERMANO, GERMANO, 2011).

O gênero *Salmonella* está agrupado em duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, divididas em cinco subespécies (JAY, 2005), possuindo 2.610 sorovares. A maioria é classificada como *S. entérica* (RODRIGUES, 2011).

As salmonelas são amplamente distribuídas na natureza, sendo o principal reservatório destas bactérias o trato intestinal dos humanos e animais de sangue quente e de sangue frio, exceto peixes, moluscos e crustáceos, os quais podem

contaminar-se após a pesca. As aves são os reservatórios mais importante desse microrganismo (VIEIRA et al., 2004).

Consideradas uma das causas mais importantes das doenças alimentares, as salmoneloses são infecções causadas pelas bactérias do gênero *Salmonella*. A contaminação de produtos alimentícios como o pescado pode ocorrer por manipulação ou contaminação cruzada desde o barco de pesca, plantas industriais até o ponto de venda. O consumidor de alimentos mal cozidos ou crus (*sushi* e *sashimis*) são expostos às infecções causadas por essas bactérias (GERMANO; GERMANO, 2011; VIEIRA et al., 2004).

O quadro de infecção gastrointestinal da salmonelose é a manifestação mais comum de infecção por *Salmonella* spp. A sintomatologia refere as dores abdominais, diarreia, febre baixa e vômito, sendo raros os casos clínicos fatais. O período de incubação é de seis horas após a ingestão do alimento contaminado, podendo durar os sintomas até 72 horas. O episódio geralmente sofre resolução em dois a três dias, não necessitando de tratamento com antibióticos (GERMANO; GERMANO, 2011).

Na infecção por *Salmonella* spp., a sintomatologia característica da doença ocorre dependendo de fatores como o tipo de alimento e a espécie de *Salmonella* envolvida. As espécies que são adaptadas aos seres humanos necessitam de uma dose infectante muito menor em relação àquelas que não são adaptadas para gerar quadro sintomatológico. Entretanto, a doença pode levar a óbito à pessoas com menor resistência às infecções, como crianças, idosos ou imunocomprometidos, (ibid.).

Na Resolução RDC nº 12 da ANVISA (BRASIL, 2001) é estipulado como padrão para *Salmonella* spp. em todas as matrizes alimentícias, incluindo pescado, a ausência do microrganismo em 25 g de amostra.

Conforme Huss (1997), peixes e mariscos são responsáveis apenas por uma pequena percentagem do número total de casos de *Salmonella* spp. referidos nos Estados Unidos e em outros países. Na maior parte dos relatórios, é indicado que o pescado é um veículo de *Salmonella* spp. menos freqüente do que outros produtos alimentares.

Damasceno (2009), em estudo com 39 amostras de salmão eviscerado e resfriado de estabelecimentos varejistas em Belo Horizonte, MG, não obteve resultados positivos para *Salmonella* spp.

Resultados negativos para *Salmonella* spp. foram encontrados em estudo com filés de peixe congelados distribuídos na cidade de Botucatu, São Paulo (SOARES et al., 2011). Haida e Muller (1984) não detectaram a bactéria na avaliação bacteriológica de sardinha (*Sardinella aurita*) *in natura* comercializada em Londrina, Paraná.

Martins (2011), avaliando a qualidade de pescada (*Macrodon ancylodon*) oriundas de São Paulo, também encontrou amostras negativas em todos os elementos amostrais (100%) em relação ao microrganismo.

Porém, há diversos relatos bibliográficos da presença da *Salmonella* spp. em pescado.

Em estudo avaliando microbiologicamente pescadinha (*Cynoscion striatus*), Dams et. al (1996) relataram 20% das amostras inteiras *in natura com* presença de *Salmonella* spp.

Jay (2005) afirmou que análise de mariscos da costa da Florida apresentaram em 43% das amostras a presença de *Salmonella* spp. Youssef et al. (1992), verificaram a presença do microrganismo em 3,9% das amostras de tilápia no Egito

Na avaliação de parâmetros bacteriológicos em mexilhão (*Perna perna*) submetidos a irradiação gama, provenientes de mitilicultura da Baía de Ilha Grande, Rio de Janeiro, Calixto (2010) identificou 21 colônias com presença do microrganismo, em um proporção de 100% das amostras do grupo controle e 40% das amostras dos dois grupos irradiados a 1,0 kGy e 1,5 kGy.

Liuson (2003) relatou resultados positivos para a bactéria em 7,8% das amostras de tilápias oriundas de pesqueiros em São Paulo, assim como Álvares et al. (2008), que constataram em 36,4% das amostras de pescado comercializado na grande São Paulo; Lobo (2009) obteve resultados positivos em 83,3% das amostras de seu estudo com pescado fresco comercializado na Bahia.

### 2.2.3 Coliformes termotolerantes

São bacilos Gram-negativos, não esporulados, capazes de reduzir nitrito a nitrato e fermentar a lactose com produção de gás quando incubadas por 24 a 48 horas em temperaturas de 44,5 a 45,5°C (FRANCO; LANDGRAF, 2005). A atividade

mínima de água necessária para o crescimento é igual a 0,95 e a faixa de pH deve se situar entre 4,4 e 8,5 (WHO, 2008).

O grupo dos coliformes fecais é composto por três gêneros de bactérias, *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter*. A *Escherichia coli* possui como habitat primário o trato intestinal dos humanos e de animais. Os outros dois gêneros podem ser encontrados no ambiente, em vegetais e solo e na água (VIEIRA et al., 2004). A presença de coliformes totais no alimento não indica, necessariamente, contaminação fecal, pois podem estar presentes no solo ou em vegetais (JAY, 2005).

A *E. coli* é a principal bactéria do grupo dos coliformes fecais. É associada a diarreias, podendo apresentar quadros graves, como colite hemorrágica, septicemia e síndrome urêmica-hemolítica (GERMANO; GERMANO, 2011). A presença dessa bactéria em pescado está relacionada a contaminação fecal da água do local de pesca ou area de cultivo e ao transporte e manuseio. Quando presente em peixes e outros organismos marinhos, estabelecem-se na sua superfície e trato intestinal (VIEIRA et al. 2004).

É um microrganismo que pode ser isolado de ambientes poluídos por matéria fecal ou esgotos, onde consegue se multiplicar e sobreviver durante um longo período neste ambiente. No entanto, foi demonstrado que a *E. coli* pode ser igualmente encontrada em águas tropicais quentes não poluídas, onde pode sobreviver indefinidamente (HUSS, 1997).

Franco e Landgraf (2005) relataram que a pesquisa de coliformes fecais nos alimentos fornece, com maior segurança, informações sobre as condições higiênico-sanitárias do produto e melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos. No entanto, é importante lembrar que cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella*, incluídas nesse grupo, podem apresentar origem não-fecal, no caso de a análise efetuada buscar a determinação de coliformes de origem gastrointestinal.

Além disso, a *E. coli* não é um bom indicador de contaminação fecal em ambientes marinhos por não resistir a salinidade da água do mar e exposição ao sol (VIERA et al., 2004).

Não há indicação de que o pescado seja uma fonte importante de infecção por *E. coli*. A maior parte das infecções parece estar relacionada com a contaminação de água ou com o manuseio do produto alimentar em condições não higiênicas (HUSS, 1997).

Conforme a legislação brasileira vigente (BRASIL, 2001), não é estipulado limites máximos para coliformes fecais na matriz alimentícia do presente estudo. Porém, muito comumente, utiliza-se o padrão estipulado por ICMSF, (1986), que preconiza, em uma amostragem representativa de cinco amostras, a tolerância de três apresentando valores entre 11 e 500 NMP/g.

Geralmente, na literatura, em estudos de avaliação microbiológica em pescado, é realizado análises pertinentes à contagem de coliformes fecais. Em alguns, é possível observar que os valores encontrados estavam abaixo do limite preconizado por ICMSF (1986).

Soares et al. (2011) concluíram em estudo com filés de peixes congelado em Botucatu, São Paulo, que as amostras estavam em condições sanitárias satisfatórias, por apresentar resultados de coliformes a 45°C entre 0 a 1,9 log UFC/g.

Em avaliação de “sashimis” de atum comercializados em Recife, Moura Filho et al. (2007) retrataram resultados com variações entre < 0,03 e 2,4 NMP/g. Valores mínimos de 3,0 NMP/g de coliformes totais e termotolerantes foram encontrados por Vieira et al. (2000), analisando 60 amostras coletadas ao longo da cadeia produtiva de filés de tilápia congelados em um frigorífico em Campina Grande, Paraíba.

Dams et al. (1996) constataram que ausência de coliformes de origem fecal em todas as amostras da pescadinha (*Cynoscion striatus*), em Florianópolis.

Também é possível observar estudos retratando altos níveis de coliformes termotolerantes em pescado encontrados em literatura.

Martins (2011), em pesquisa de parâmetros de qualidade da pescada (*Macrodon ancylodon*), encontrou 1,67% dos elementos amostrais apresentando valores acima do estabelecido pelo ICMSF (1986), assim como Forcelini (2009), que obteve valores máximos em amostras de ostras entre 1176, 276 NMP/g no ponto interno e 413,576 NMP/g no ponto externo da Baía de Guaratuba, Paraná.

Dias (1998) verificou valores de coliformes termotolerantes superiores ao limite máximo permitido em 60% das amostras ao avaliar microbiologicamente 50 amostras de “sushis” e “sashimis” de restaurantes do Rio de Janeiro.

Em estudo de pescado fresco comercializado em Feira de Santana, Bahia, foram encontrados em 100% das amostras coletadas números elevados de coliformes totais e termotolerantes, com valores acima de  $1,1 \times 10^3$  NMP/g de alimento (LOBO, 2009).

#### 2.2.4 *Vibrio parahaemolyticus*

O *Vibrio parahaemolyticus* é uma bactéria Gram negativa que se apresenta na forma de bastonetes curtos. É anaeróbio facultativo e mesófilo, podendo crescer em temperaturas entre 10 a 42°C. Possui crescimento ideal em temperaturas de 35 a 37°C (VIEIRA et al., 2004).

Cresce em faixa de pH entre 6 e 11, possuindo pH ótimo de crescimento a 7,6 (WHO, 2008). Apresenta halofilismo restrito, exigindo um mínimo de 1% de cloreto de sódio (NaCl) para crescimento em condições de isolamento e identificação (ibid.).

O ambiente marinho é habitat natural do *V. parahaemolyticus*. Em meses frios, utiliza o lodo marinho como reservatório, e em temperaturas mais quentes, é encontrado livremente na água do mar ou peixes e moluscos, por serem microrganismos mesófilos (CVE, 2008).

É isolado de águas da costa e de estuários, sedimentos, alimento marinhos como peixes, crustáceos e moluscos, principalmente nos meses mais quentes do ano quando a temperatura do mar é mais elevada, sugerindo uma característica de sazonalidade (ICMSF, 1986). Segundo Vieira et al. (2004), encontra-se comumente em regiões tropicais e subtropicais, possuindo distribuição cosmopolita.

Os moluscos bivalves, por serem animais filtradores, possuem característica concentradora e podem ser utilizados de forma bastante eficaz para o monitoramento de poluição ambiental (LIRA et al., 2001). São animais macrófagos que se alimentam de partículas e microrganismos em suspensão na água. O processo de filtração permite a retenção e acúmulo de poluentes e bactérias patogênicas ao homem (RIPPEY, 1994).

Comumente, encontram-se relatos mundiais da presença do microrganismo em moluscos bivalves. Em 1998, o *V. parahaemolyticus* foi o agente etiológico de um surto envolvendo 23 pessoas que moravam em Nova Jersey e Nova Iorque, as quais se alimentaram com ostras cruas e moluscos provenientes de Long Island, Nova Iorque. No ano de 1997, em Washington, Oregon e Califórnia, o *V. parahaemolyticus* fez 209 vítimas decorrente da ingestão de ostras cruas contaminadas (JAY, 2005).

Pereira et al. (2007) constataram resultados positivos em 11,6% amostras *in natura* em estudo com mexilhões (*Perna perna*) em Niterói, Rio de Janeiro. Em

análise da qualidade microbiológica de ostras (*Crassostrea gigas*) produzidas e comercializadas em Florianópolis, foi detectada a presença de *V. parahaemolyticus* em nove das 90 amostras coletadas (PEREIRA et al., 2006).

Os fatores de patogenicidade do agente estão relacionados à capacidade da bactéria de produzir enzimas hemolíticas citotóxicas denominadas hemolisina termoestável direta (do inglês TDH) e hemolisina termoestável relacionada com TDH (do inglês TRH), promovendo o fenômeno designado como Kanagawa (HONDA et al., 1988). No entanto, a patogenicidade também é atribuída à capacidade de invasão do agente em células epiteliais intestinais (AKEDA et al., 1997).

No Japão, o microrganismo tem sido responsável por até 60% dos incidentes de intoxicação e infecção alimentar, onde grande quantidade de produtos marinhos é consumida crua (SÁ, 2004). Em Hong Kong, em uma avaliação realizada no período de 1999 a 2003 pelo Departamento de Higiene Ambiental e Alimentar, foi demonstrado no pescado o isolamento do microrganismo em 313 (56,7%) dos casos confirmados, dentre 1.465 (53,8%) pessoas afetadas (FEHD, 2005).

Os sintomas mais comumente descritos e associados com infecções causadas por *V. parahaemolyticus* são: diarreia, câibras abdominais, náusea, vômito, cefaléia, febre e calafrios (VIEIRA et al., 2004). Diarreia com sangue ou muco pode ser observada. Geralmente, é um processo leve a moderado, embora alguns casos sejam graves. Tem como duração de dois a sete dias. O período de incubação é entre 12 a 24 horas após ingestão do alimento contaminado (CVE, 2008).

Nenhuma correlação tem sido observada entre a presença de *V. parahaemolyticus* e coliformes fecais, ou qualquer outro indicador de poluição. Entretanto, existe uma comprovada variação sazonal no isolamento dessa bactéria do ambiente, principalmente em águas temperadas, além de uma forte influência da temperatura da água, salinidade e associação com organismos planctônicos (VIEIRA et al., 2004).

Na literatura, há relatos da ocorrência de *V. parahaemolyticus* em pescado em diversos países, inclusive no Brasil.

Em estudo da avaliação da qualidade de pescado na Croácia, Jaksic et al. (2002) obtiveram a presença do agente em 11 amostras. Hofer e Silva (1986) constataram que, de 82 peixes marinhos de diferentes espécies, capturados na faixa

de litoral compreendida entre Bahia e Rio Grande do Sul, 54,8% apresentaram resultados positivos.

Chen (2004) obteve cerca de 4% de amostras positivas avaliando a qualidade de atum (*Thunnus* spp.) comercializado em São Paulo.

Casos de diarreia foram associados ao consumo de mariscos e peixes contaminados por *V. parahaemolyticus* no Recife (MAGALHÃES et al., 1991). Matté et al. (2007) avaliaram a distribuição de espécies de vibrios potencialmente patogênicos em pescado, e de 25 amostras de peixes e frutos do mar, foram observadas 4 (16%) para *V. parahaemolyticus*.

Importante relatar que algumas pesquisas constam a ausência do microrganismo em pescado cru e fresco. Na avaliação de “sashimis” de atum comercializados em Recife (MOURA FILHO et al., 2007), a bactéria não foi identificada nas amostras, sendo observado somente a presença de outras cepas de *Vibrio* spp. nas amostras de todos os restaurantes estudados. Albuquerque et al. (2006) relataram também a ausência do microrganismo em estudo com 30 amostras de “sushis” comercializados em cinco estabelecimentos em Fortaleza, Ceará.

Dams et al. (1996) não constataram a presença de *V. parahaemolyticus* na amostragem, em estudo realizado com pescadinha (*Cynoscion striatus*) em Florianópolis. Silva (2007) também não encontrou a bactéria em análise de qualidade sanitária de peixes comercializados na cidade de São Paulo.

### 2.2.5 *Staphylococcus* coagulase positiva

*Staphylococcus* spp. são cocos pequenos, esféricos, imóveis, Gram-positivos, que tendem a formar agrupamentos de cachos de uva, podendo se apresentar também isolados e em grupos de dois ou quatro. São anaeróbios facultativos, com maior crescimento sob condições de aerobiose (VIEIRA et al., 2004).

As bactérias desse gênero são mesófilas, apresentando temperatura de crescimento na faixa de 7,0 a 47,8°C, com o ótimo na faixa de 30 a 37°C. Produzem enterotoxinas em temperaturas entre 10 e 46°C, com ótimo entre 40 e 45°C (ibid.). Crescem em faixa de pH entre 4,0 e 9,3, com faixa ótima entre 7,0 e 7,5. A atividade



de água mínima necessária é 0,83 (WHO, 2008). São halotolerantes, podendo resistir a concentrações de 10 a 20% de NaCl presente em alimentos (FRANCO; LANGRAF, 2005).

Segundo Jay (2005), não são bons competidores com outras bactérias. Assim, raramente causam doença alimentar após ingestão de produtos crus por muitas vezes ter seu crescimento inibido. O microrganismo é inativado rapidamente pelo calor, mas é resistente a secagem e tolerante a altas concentrações de sal.

Os estafilococos possuem como habitat a pele, as glândulas e as membranas mucosas de mamíferos e aves, podendo ser encontrados em diferentes regiões do corpo como garganta, faringe, glândulas mamárias, trato intestinal e urinário (VIEIRA et al., 2004).

Segundo Vieira et al. (2004), a presença de *S. aureus* no ambiente marinho tem sido relacionada ao número de banhistas, podendo ser considerada um indicador de risco para a pele, olhos e ouvidos. A resistência de *S. aureus* na água do mar (por até 96 horas), justificam a presença como indicadora de poluição antrópica.

O pescado pode estar contaminado com *Staphylococcus* spp. provenientes de manipuladores infectados ou do ambiente. Essa bactéria produz um certo número de enterotoxinas quando se desenvolve nos produtos alimentares. Estas toxinas são, em geral, muito resistentes à enzimas proteolíticas e ao calor, e são as causadoras das intoxicações alimentares pelo microrganismo (HUSS, 1997).

Os sintomas consistem em náuseas, vômitos, diarreias, dores abdominais, dor de cabeça, sudorese, prostração e sede, que aparecem geralmente dentro de quatro horas após ingestão de alimento contaminado (JAY, 2005).

O padrão preconizado pela legislação brasileira, Resolução RDC nº 12 da ANVISA (BRASIL, 2001), é de no máximo  $10^3$  em pescado *in natura*, resfriados ou congelados não consumidos crus.

Vieira et al. (2004) relataram que, dos 359 surtos de intoxicação alimentar e casos esporádicos por *S. aureus* ocorridos na Inglaterra, apenas 7% foi proveniente de pescado, enquanto que no Japão, no período de 1987 a 1996, a presença da bactéria foi relatada em 958 casos e 43 surtos, envolvendo pescado e frutos do mar, podendo ser considerado índices baixos.

Na análise de 175 amostras de pescado de Florianópolis, *S. aureus* foi detectado em apenas 20% da amostragem, sendo 60% em moluscos (AYULO et al.,1994).

Pesquisadores também observaram a ausência da bactéria em pescado fresco. Em estudo com amostras de salmão eviscerado e resfriado de comércio varejista de Belo Horizonte, Damasceno (2009) não encontrou amostra positiva para *Staphylococcus* coagulase positiva. Dams et al. (1996) obtiveram ausência do microrganismo avaliando pescadinha (*Cynoscion striatus*). Soares et al. (2011), também não encontraram a bactéria avaliando filés congelados de pescado em São Paulo.

Há poucos relatos de sua presença em altos níveis de contaminação no pescado fresco. Haida e Muller (1984) obtiveram 45,30% de amostras de sardinhas comercializadas em Londrina, Paraná, positivas para o microrganismo, com valores acima da ordem de  $10^3$  UFC/g.

## 2.2.6 Legislações nacionais e internacionais

Na Resolução RDC nº 12 da ANVISA (BRASIL, 2001), legislação brasileira, são estipulados limites máximos de crescimento de microrganismos em diferentes matrizes alimentícias, incluindo o pescado.

Porém, para o pescado fresco, há legislações internacionais que, quando utilizadas, servem como base de comparação e complementação para os padrões brasileiros.

Os quadros 1 e 2 constam limites máximo estipulados por legislações nacionais e internacionais para diferentes análises microbiológicas em pescado.

Quadro 1: Padrões bacteriológicos estipulados para CBHAM, CBHAP, coliformes termotolerantes e *S. coagulase* positiva em pescado.

Localidade	Limites máximos estabelecidos			Autor(es)
	CBHAM CBHAP	Coliformes termotolerantes	<i>S. coagulase</i> positiva	
Brasil	-	-	10 <sup>3</sup> UFC/g	BRASIL, 2003
ICMSF	10 <sup>7</sup> UFC/g	11 a 500 NMP/g	-	ICMSF, 1986
FAO	10 <sup>4</sup> UFC/g	100 NMP/g	10 <sup>2</sup> UFC/g	HUSS, 1997
África do Sul	10 <sup>6</sup> UFC/g	< 10 NMP/100 g	Ausência em 20 g	ÁFRICA DO SUL, 2000
Nova Zelândia	10 <sup>6</sup> UFC/g	10 <sup>3</sup> UFC/g	10 <sup>3</sup> UFC/g	NOVA ZELÂNDIA, 1995
Japão*	10 <sup>4</sup> UFC/g	Negativo	-	FAO, 2005
Hong Kong**	< 10 <sup>6</sup> UFC/g	-	< 20 NMP/g	HONG KONG, 2001

\* Para pescado para consumo cru (filés de peixe, moluscos bivalves desconchados, alimentos congelado de peixe.

\*\* Para crustáceos, outros peixes cozidos, “sashimi/sushi” de filé de peixe ou com ovas, farinha de pescado.

Quadro 2: Padrões bacteriológicos estipulados para *Salmonella* spp. e *V. parahaemolyticus* em pescado.

Localidade	Limites máximos estabelecidos		Autor(es)
	<i>Salmonella</i> spp.	<i>V. parahaemolyticus</i>	
Brasil	Ausência em 25 g	-	BRASIL, 2003
ICMSF	-	10 <sup>3</sup> UFC/g***	ICMSF, 1986
FAO	10 <sup>2</sup> UFC/g	10 <sup>5</sup> UFC/g	HUSS, 1997
África do Sul	Ausência em 20 g	Ausência em 20 g	ÁFRICA DO SUL, 2000
Nova Zelândia	Ausência	-	NOVA ZELÂNDIA, 1995
Japão*	-	100 NMP/g	FAO, 2005
Hong Kong**	Ausência em 25 g	100 NMP/g	HONG KONG, 2001

\*\* Para pescado para consumo cru (filés de peixe, moluscos bivalves desconchados, alimentos congelado de peixe.

\*\* Para crustáceos, outros peixes cozidos, “sashimi/sushi” de filé de peixe ou com ovas, farinha de pescado.

\*\*\*Para peixes que habitam águas quentes e costeiras, principalmente destinados ao consumo cru.

## 2.3 A BIOLOGIA DO CAÇÃO

O tubarão, também conhecido como cação, pertence à classe Chondrichthyes, cuja característica principal é o esqueleto cartilaginoso e não ósseo, e à subclasse Elasmobranchii, onde são divididos em 35 famílias e 465 espécies com características muito variadas. São peixes predadores, sendo os principais de sua comunidade (MACEDO, 2010).

Há inúmeras diferenças entre os cações e os demais peixes ósseos. Além do esqueleto, como citado anteriormente, sua pele possui escamas placóides, de origem dermo-epidérmica, a boca é ventral, não possui bexiga natatória, suas nadadeiras são heterocercas, assim como possui o cláasper, e são ovovivíparos.

Segundo Macedo (2010), a manutenção de seu equilíbrio osmótico é feita com auxílio da presença de uréia e óxido de trimetilamina em seu sangue e tecidos. Não possui o trato urinário usual, então a uréia presente no sangue, subproduto não tóxico do metabolismo, é excretada através da pele, e após a captura deve ser eliminada pela sangria. No quadro 3, constam algumas diferenças existentes entre os peixes ósseos e cartilagosos.

Quadro 3: Diferenças entre peixes ósseos e cartilagosos.

<b>Peixes ósseos</b>	<b>Peixes cartilagosos</b>
Esqueleto ósseo	Esqueleto cartilaginoso
Escamas meso-dérmicas	Escamas placóides de origem dermo-epidérmica
Boca frontal	Boca ventral
Nadadeiras homocercas ou difercas	Nadadeiras heterocercas
Presença de bexiga natatória	Ausência de bexiga natatória
Fecundação externa	Fecundação interna - machos: presença de cláasper
1 par de brânquias com guelras	5 a 7 pares de brânquias sem guelras
Excreção de amônia	Excreção de uréia

Após a pesca, a uréia é transformada por bactérias em amônia, tóxica, e por isso a validade do produto fresco é bem pequena. Logo, o manuseio impróprio pode levar a odor e gosto forte de amônia (VANNUCCINI, 1999).

Em etapas posteriores, as enzimas proteolíticas que os microrganismos segregam atacam as proteínas (degradação protéica), ocasionando um amolecimento gradual da carne (VIEIRA et al., 2004). Além disso, os cações, por serem predadores e estarem no topo da cadeia alimentar, podem acumular altas concentrações de compostos potencialmente tóxicos.

É um recurso marinho valioso, que sustenta a pesca em vários países, com altos números de produção (exploração) (ibid.).

A carne de cação possui valor comercial, sendo uma importante fonte de proteínas. Possui bom aproveitamento industrial, pois além das várias formas de processamento de sua carne (resfriada, congelada, salgada seca, salmourada e defumada), também as barbatanas, para a fabricação de sopa, considerada afrodisíaca em países asiáticos, têm alto valor agregado. Além disso, sua pele é usada para fabricação de couro e lixa, os dentes em bijouteria e o óleo de fígado com fins farmacêuticos (MACEDO, 2010). Além da utilização de sua cartilagem em indústria de cosméticos, há relatos do uso de sulfato de condroitina dela extraído, para tratamento de osteoartrite, osteoporose e câncer (VANNUCCINI, 1999).

## 2.4 DADOS DE CAPTURA E COMERCIALIZAÇÃO DO CAÇÃO

Beirão et al. (1996) afirmaram que, na época da publicação de seu artigo, os cações eram abundantes, mas ainda pouco consumidos como alimento humano, quando considerado o potencial de pesca da espécie. Ogawa (1973) relatou fatores que impediam o incremento de seu uso, sendo o mais importante o alto teor de uréia contido no músculo.

Atualmente, esse quadro mudou. A captura total de elasmobrânquios no mundo, incluindo raias, quimeras e esqualos, variou aproximadamente de 839,1 a 869,5 mil toneladas ao ano, entre 2000 e 2003. No Brasil, no mesmo período, produziu-se cerca de 12,8 a 21,7 mil toneladas ao ano (LACK; SANT, 2006).

Bonfil (1994) afirmou que a pesca de elasmobrânquios no Brasil possui um bom grau de estabilidade. Após um início lento mas constante nos anos 60 e uma queda breve na década de 70, a captura de tubarões e raias sofreu um grande salto no início dos anos 80.

Nas estatísticas de desembarques de elasmobrânquios em 1997, o Rio de Janeiro foi superado apenas por Santa Catarina, em comparação entre os estados das regiões Sudeste e Sul (SBEEL, 2005).

Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2007), a produção de pesca marinha evoluiu no Estado do Rio de Janeiro, entre os anos de 2001 a 2007. Em 2001, foram pescados cerca de 63.462,5 mil toneladas, enquanto em 2007, esse número aumentou para 82.528,5 mil toneladas. No Rio de Janeiro, em 2009, a venda de pescado fresco totalizou 134.140 toneladas, considerando mercados, feiras, peixarias, restaurantes e afins e supermercados, sendo estimado uma média anual *per capita* de 18,5 kg, equivalente em “peso inteiro”, mostrando um aumento em comparação ao ano de 1996, que registrou 16,4 kg (FAO, 2011).

A estatística da “Food and Agriculture Organization” (ibid.) apontou um consumo global de pescado em elevação, passando de 9 kg em 1961 para 16,6 em 2004.

Em pesquisa realizada por Barroso e Wiefels (2010), registraram o custo de R\$ 22,00 em relação à R\$/kg do filé de cação oferecidos em feiras livres dos municípios de Niterói e Rio de Janeiro no período de outubro de 2009, sendo coincidente com os nossos registros realizados em 2010, 2011 e 2012.

Nas mesmas condições, o preço do filé em peixarias de Niterói estava entre 18,00 e 24,00 reais, enquanto no Mercado São Pedro (Niterói), variava entre 12,00 e 17,99 reais. Em supermercados da Baixada Fluminense, este era em torno de R\$ 22,00, enquanto na zona Sul do Rio de Janeiro, R\$ 23,99 (ibid.)

Segundo Barroso e Wiefels (2010), o filé de cação se encontrava em 5º lugar dentre pescado importado mais vendido nos supermercados do Rio de Janeiro em 2009, com 4% das vendas, mesmo existindo vários fatores que dificultam a expansão do comércio de pescado em supermercados, como o alto custo de investimentos nas instalações, a pouca oferta e pouca demanda, o odor, entre outros.

Na literatura, não há estudos referentes ao filé de cação quanto à análise sensorial. Porém, é observado que, de forma geral, a carne de pescado é um alimento bastante aceito pelos consumidores.

Em estudo com matrinxã (*Brycon cephalus*) procedente de piscicultura, foi verificado que a referida espécie alterou-se levemente até 20 dias de estocagem, em

análise de odor, sabor e textura da musculatura do animal. Foram classificadas neste período de tempo como alimento classe A (especial) (BATISTA et al., 2004).

Silva (2010), analisando validade comercial de sardinhas verdadeiras (*Sardinella brasilienses*) e sardinhas boca-torta (*Cetengraulis edentulus*) no estado do Rio de Janeiro, realizou método de índice de qualidade e obteve inicialmente os escores médios de 1,83 e 2,00, respectivamente.

Bernardi (2012), em avaliação da validade comercial de peixe-sapo (*Lophius gastrophysus*), encontrou no teste de aceitação diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre as amostras para os atributos aparência, sabor, textura e impressão global e para a intenção de compra, observando-se melhor aceitação para a amostra no dia zero, sem, contudo, haver rejeição dos consumidores pelas amostras no dia quatro.

Em pesquisa de prazo de validade comercial do atum (*Thunnus atlanticus*) armazenado sob refrigeração, Andrade (2006) realizou análise sensorial em amostras recém-chegadas no laboratório e em exemplares estocados em temperatura de refrigeração por nove dias. A autora relatou que as amostras de atum frescas obtiveram melhor aceitação no atributo sabor que as estocadas em gelo, e não houve diferença significativa estatisticamente em relação à textura e impressão global.

Borges (2005), em estudo da qualidade da corvina (*Micropogonias furnieri*) eviscerada e inteira em diferentes períodos de estocagem à temperatura de 0°C, obteve nos dias zero, sete e 15 de estocagem sob gelo os escores de aceitação entre seis e oito, e concluiu que as corvinas foram bem aceitas pelos julgadores.

Na avaliação da qualidade do frescor da pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*), obteve-se 60 elementos amostrais, sendo 30 em período de inverno e 30 no verão. Martins (2011) relatou que, pela análise sensorial, foi confirmada diferença significativa entre os períodos de inverno e verão para os atributos de aceitação de aparência, do frescor e intenção de compra. De modo geral, a pescada obteve avaliação dos consumidores entre boa e moderada, tendo a maior parte de respostas perante os diferentes atributos como positivas.

Fontes et al. (2007) verificaram que os produtos variaram entre “bom” e “satisfatório” (entre estados de frescor “ótimo”, “bom” e “satisfatórios”) em estudo sobre o estado de frescor de pescado comercializados no varejo de Portugal, obtendo como resultados todas as amostras aptas para consumo.

Além disso, o Brasil é o principal mercado para produtos de tubarão na América Latina. Cerca de 90% dos seus desembarques são vendidos frescos ou refrigerados na forma de filetes, enquanto que os produtos congelados são destinados à exportação. No ano de 1997, no Brasil, houve a importação de 280 toneladas de carne de tubarão no valor de U\$ 352.000, e a exportação de 37 toneladas no valor de U\$ 38.000 (VANNUCCINI, 1999).

É importante também pontuar que não há um padrão de identidade e qualidade vigente para este alimento no Brasil, assim como há ausência de dados científicos do mesmo, o que dificulta a caracterização ideal do produto relacionada à segurança dos alimentos.

Diferentes espécies de cação são comercializadas e normalmente empregadas como alimento no Brasil (MORALES-AIZPURÚA et al., 1999). Uma dessas espécies, facilmente encontrada no Estado do Rio de Janeiro, mais especificamente no município de Niterói, é o cação conhecido popularmente como Anequim (*Isurus oxyrinchus*).

## 2.5 CAÇÃO ANEQUIM (*Isurus oxyrinchus*)

O tubarão Anequim pertence à Subclasse Elasmobranchii, Superordem Selachimorpha, Ordem Lamniformes, Família Lamnidae, Gênero *Isurus*, sendo da espécie *Isurus oxyrinchus* (Rafinesque, 1809). É conhecido na língua americana como “Shortfin Mako Shark” (Fig. 1).



Fig. 1: Um exemplar de Cação Anequim.  
Fonte: Enciclopedia (2006).



É uma espécie de grande porte que se distribui em águas tropicais e mares quentes temperados de todos os oceanos no ambiente pelágico, sendo encontrados desde a superfície até profundidades de 150 metros, usualmente em temperaturas acima de 16°C (Fig. 2) (COMPAGNO, 2002).

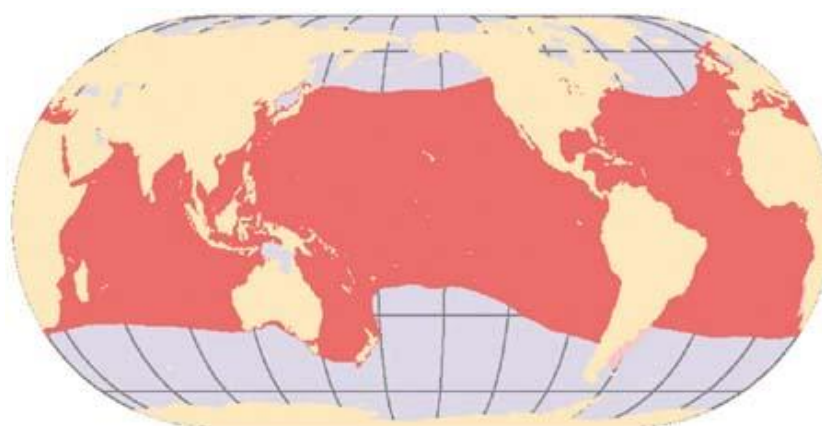


Fig. 2: Distribuição geográfica do Cação Anequim.  
Fonte: Enciclopedia (2006).

É encontrado em todo o mundo (NEW BRUNSWICK, 2011). No Atlântico ocidental, pode estar distribuído a partir da Argentina e no Golfo do México. Em águas canadenses estes tubarões não são abundantes por preferirem águas quentes, mas também não são raros.

Possui corpo fusiforme, um longo focinho cônico, cujo inferior é branco, curtas barbatanas peitorais e uma nadadeira caudal em meia-lua. Há uma quilha distinta na base caudal, não apresentando quilhas secundárias na base da nadadeira caudal. A boca é em formato de U e seus dentes são longos, delgados e ligeiramente curvados sem cúspides laterais ou serrilhas, e são visíveis mesmo quando a boca está fechada. Possui uma coloração marcante: dorsalmente é um metálico azul índigo, enquanto ventralmente é branco (FAO, 2012).

O Anequim pode crescer até 3,9 m. Ainda há incerteza sobre a sua vida útil, mas suspeita-se chegar a idades entre 11-23 anos (ibid.).

Como um dos mais rápidos tubarões no oceano, esse tubarão possui uma poderosa explosão, que pode atingir velocidades de natação de até 35 km/h e pode saltar fora da água a alturas de até 6 metros (ibid.).

São altamente migratórios e possuem uma tendência a seguir movimentos de massas de água quente, principalmente no verão (COMPAGNO, 2002).

Conforme Compagno (2002), a espécie é ovovivípara, gerando até 30 filhotes em uma ninhada. Os filhotes podem ser canibais uterinos. O nascimento ocorre principalmente no final do inverno e início do verão nos dois hemisférios. Estimativas do período de gestação variam, mas é sugerido que pode ser de 15 a 18 meses dentro de um ciclo reprodutivo de três anos, incluindo um intervalo de um ano entre as gestações.

Os Anequins podem amadurecer com uma idade mínima de 7 a 8 anos, baseado na adição anual dos anéis de crescimento no centro vertebral (ibid.).

Sua dieta consiste principalmente de peixes ósseos, incluindo cavalas, atuns, bonitos e espadarte, mas também podem comer outros tubarões, lulas e tartarugas marinhas, entre outros. De acordo com FAO (2012), os mamíferos marinhos, em especial golfinhos pelágicos, são raramente relatados na dieta do Anequim, podendo ser encontrados em grandes indivíduos da espécie.

A espécie, aparentemente, possui poucos predadores naturais, talvez por sua velocidade alta e grande tamanho. Os principais predadores são os seres humanos, na forma de pesca comercial. Não são imunes a predação pelo tubarão branco (*Carcharodon carcharias*), que é muito veloz na perseguição de suas presas (COMPAGNO, 2002).

*I. oxyrinchus* é uma espécie de interesse comercial. Diferente da maioria dos tubarões, em que apenas as barbatanas são os subprodutos aproveitados, a carne dele possui valor comercial relativamente alto e, portanto, também é aproveitada nas pescarias oceânicas, sobretudo no espinhel de superfície voltado para atuns e espadartes (CASTRO et al., 1999). A espécie também é considerada nobre na pescaria esportiva (FAO, 2012). É importante para a pesca com espinhel pelágico, assim como é capturado na pesca com redes de emalhar. Na pesca do atum e do espadarte, é tido como captura acessória (COMPAGNO, 2002).

No Brasil, a pesca oceânica com espinhel pelágico é realizada desde a década de 1960, mas o efeito dessa atividade nas populações do tubarão Anequim é desconhecido (ICCAT, 2008). Nas regiões Sul e Sudeste do país, o tubarão Anequim é a segunda espécie de tubarão mais capturada na pesca de espinhel, superada apenas pelo tubarão azul, *Prionace glauca* (MONTEALEGRE-QUIJANO et

al., 2007). Essa alta frequência de captura e o alto valor comercial tornam essas espécies como uns dos principais alvos das pescarias oceânicas.

A espécie é considerada uma das melhores para uso na alimentação humana. Por causa de seu alto valor de mercado, o Anequim geralmente é retido em algumas frotas de pesca pelágica com altas taxas de captura acidental de tubarões.

Estatísticas de captura do cação Anequim tem sido relatada a FAO somente dos Estados Unidos na região noroeste do Oceano Atlântico. Iniciada em 1987 e finalizada em 1995, obteve um pico de captura em 1993 de 71 toneladas. Em 1997, a captura desta espécie totalizou 60 toneladas, sendo dados relatados pela Nova Zelândia, EUA e Brasil. Dados relativos deste mesmo ano demonstram que, na América do Sul, a Argentina se encontrava como líder da pesca de elasmobrânquios com 29.000 t., seguido pelo Brasil, com 14.700 t. (VANNUCCINI, 1999). A captura total reportada para FAO em 1999 foi de 896 t. Os países com as maiores capturas foram o Chile (379 t.) e Espanha (335 t.) (FAO, 2012).

Segundo a Sociedade Brasileira para o estudo de Elasmobrânquios (SBEEL) (2005), o cação Anequim é encontrado e pescado comumente em todas as regiões brasileiras, desde o início da pesca de elasmobrânquios oceânicos no Brasil em 1959, com o surgimento do espinhel.

Na década de 90, na pesca de espinhel de superfície em Santa Catarina, os desembarques de elasmobrânquios representaram 48,2% do capturado, sendo 3,7% do total de cação Anequim (ibid.).

Conforme dados da pesca extrativa no Rio de Janeiro, em 2005, de um total geral de 63.716 toneladas das principais espécies marinhas, o cação Anequim representou um total de 2,5 toneladas de pesca industrial (ibid.).

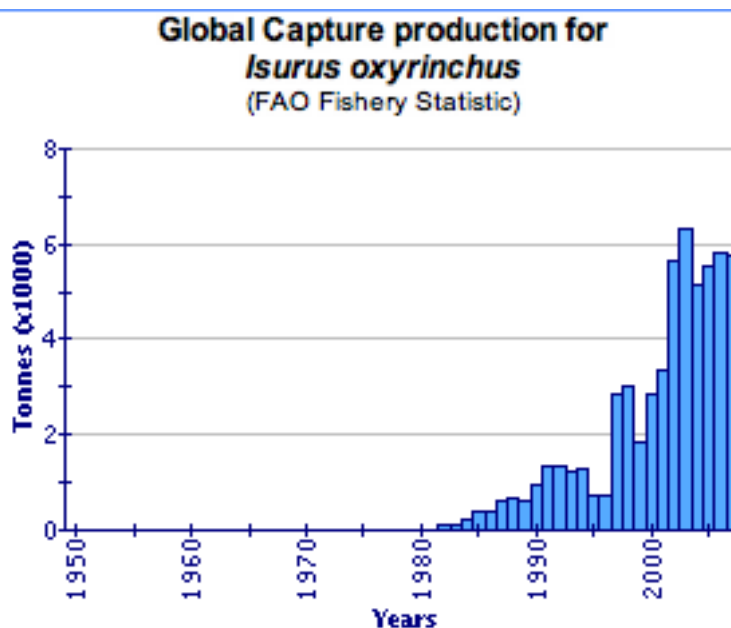


Fig. 3: Captura global de *Isurus oxyrinchus*.  
Fonte: FAO (2012).

Nas décadas de 80 e 90, a exploração humana de tubarões aumentou significativamente em todo o mundo, com o resultado de que algumas espécies estão entre as ameaçadas de extinção em várias áreas (VANNUCCINI, 1999).

Há vários conjuntos de dados que poderiam ser usados para avaliar o impacto da pesca sobre os tubarões Anequins, porém estes possuem qualidade limitada e muitas vezes informações conflitantes, não fornecendo uma imagem clara da situação (FAO, 2012).

FAO (2012) relatou que o Anequim tem um potencial de recuperação intrínseco de médio porte. Este, juntamente com a distribuição mundial e a relativa grande abundância em algumas áreas, oferece proteção à conservação das espécies a nível global. Entretanto, como qualquer outro elasmobrânquio por sua característica biológica de baixo potencial reprodutivo, pode ser facilmente sobre-explotado, não havendo o controle ideal.

Historicamente, no Noroeste do Oceano Atlântico na década de 60, a população da espécie sofreu um declínio devido às capturas intensivas (VANNUCCINI, 1999). A espécie foi considerada em 1983 como menor risco na lista vermelha de espécies quase ameaçadas de extinção da União Internacional para Conservação da Natureza e Recursos Naturais (FAO, 2012). Em 1999, Castro, Woodley e Brudeck avaliaram o estado de todas as espécies válidas de tubarões

listadas anteriormente com algumas adições e mudanças, dividindo-as em dois grupos: espécies não-exploradas e as exploradas, sendo este último grupo dividido em quatro categorias. O cação Anequim, na época, foi listado como uma espécie explorada, pela pesca ou tomado como captura acessória, de categoria 4, o que corresponde à espécies que mostram declínios substanciais das capturas históricas e/ou se tornaram localmente extintas. De acordo com FAO (2012), a espécie em questão está atualmente aguardando o consenso de especialistas da União Internacional para Conservação da Natureza e Recurso Naturais.

A gestão da pesca de tubarões possui sérias dificuldades por apresentar conhecimento limitado da biologia, tamanho e congruência de suas populações, o volume real da captura e de sua dinâmica populacional. São poucas as nações que financiam pesquisas, monitoram o comércio ou realizam outros programas de gestão sustentável para os tubarões (VANNUCCINI, 1999). Não existem tratados internacionais e estratégias de gestão para tubarões capturados em alto-mar, e apenas a Austrália, Canadá, Nova Zelândia e EUA (costa Atlântica somente) começaram a gerenciar estes animais em águas costeiras. Planos de manejo estão em desenvolvimento no México e África do Sul, e restrições à pesca do tubarão são configurados na África do Sul, Austrália, Nova Zelândia, União Européia, Canadá, EUA, Brasil, Filipinas e Israel (VANNUCCINI, 1999).

A carne do cação Anequim é utilizada fresca, congelada, salgada e seca e defumada para consumo humano, o óleo é extraído para obtenção de vitaminas, as barbatanas são usadas para produção da sopa de barbatana de tubarão, a cartilagem é processada em couro, e maxilares e dentes usados como artefatos (ibid.).

Vannuccini (1999) descreveu que a barbatana do *I. oxyrinchus* é considerada como de primeira escolha, juntamente com as de outras espécies, como as do tubarão-azul e tubarão-martelo. Porém, este regime não deve ser considerado como uma realidade estática em todo mundo, mas como uma tendência, já que as preferências de barbatanas podem mudar de um país ou uma pessoa à outra. Brasil e Uruguai são os únicos países latino-americanos que relatam a produção de barbatanas de tubarão à FAO, sendo o mercado brasileiro o principal exportador deste produto.

Uma porção de 100 gramas do filé do cação Anequim contém 130 calorias, 4,51 g de gordura total, 0,925 g de ácidos graxos saturados totais, 0 g de

carboidratos (açúcares e fibra alimentar total), 51 mg de colesterol, 36,5 mcg de selênio, 79 mg de sódio e 20,98 g de proteínas (NOAA, 2011). Franco (2001) relatou que 100 g de filé de cação cru contém 99,5 calorias, 24,32 g de proteínas, 0,17 g de lipídios, 8 mg de cálcio, 141 mg de fósforo e 2,23 mg de ferro. Já a mesma quantidade de filé de cação dessecado contém 195,3 calorias, 46,80 g de proteínas e 0,90 g de lipídios. Em ambas, não há a presença de glicídios.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF) e na Faculdade de Nutrição Emília de Jesus Ferreiro da UFF.

#### 3.1 METODOLOGIA

A seguir, são descritas as metodologias que foram utilizadas na presente dissertação.

##### 3.1.1 Coleta e transporte

No presente trabalho, foram utilizadas 17 amostras de carne de cação fresca, da espécie *Isurus oxyrinchus*, provenientes de mercados, localizados no município de Niterói, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

A cada semana, foram adquiridas três amostras, de 1,5 kg cada, sendo observados em sua compra o preço das mesmas, como estavam sendo vendidas e sua manipulação (Fig. 4). Apenas na última semana foram compradas duas amostras por falta da matéria-prima.

As amostras, ao serem adquiridas, receberam como meio de identificação números sequenciais, de 1 a 17. O preço das amostras variou entre R\$ 19,00 (na data de 14/08/12) e R\$ 28,00 (em 10/07/12) o quilo do filé. A coleta foi realizada às terças-feiras, entre 8 e 9 horas da manhã.

As amostras estavam sobre gelo, com exceção das de número 6, 7, 9, 10, 12 e 17, que estavam apenas sobre uma tábua de plástico, sem gelo. Os manipuladores comumente vestiam um avental branco, sendo que os referentes às amostras 3, 7, 12 e 14 usavam também um boné. O manipulador da amostra 10 não utilizava o avental e o boné, enquanto o referente à amostra 17 estava fumando cigarro no ato da compra.



Fig. 4: Comercialização de uma das amostras sobre gelo em mercado, 24/07/12.

O período total de compra foi do dia 10 de julho a 21 de agosto de 2012, totalizando seis semanas de compras. Na semana de 17 a 23 de julho não houve a compra das amostras por necessidade de preparo de meios de cultura para as análises bacteriológicas.

Na aquisição, as amostras foram acondicionadas em duas caixas de poliestireno expandido com quantidade suficiente de gelo para as cobrir completamente (gelo embaixo e acima de cada amostra) e transportadas para o Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal da UFF, onde havia o preparo das amostras para realização das análises bacteriológicas. Após o preparo, foram acondicionadas em um freezer do Laboratório de Aquicultura da UFF, onde foram congeladas para posterior análise sensorial.

### 3.1.2 Análises bacteriológicas

As análises foram realizadas no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal do Departamento de Tecnologia de Alimentos de Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF), baseadas na IN n° 62 (BRASIL, 2003) e RDC n° 12 (BRASIL, 2001), sob orientação do Prof. Dr. Robson Maia Franco.



Esta etapa do experimento ocorreu entre as datas de 11 de junho a 09 de julho de 2012, com a preparação dos meios de cultura e materiais necessários para a realização das análises, 10 de julho a 28 de agosto de 2012, com a realização das análises propostas e no período de 03 a 11 de outubro de 2012, referente as provas adicionais bioquímicas para confirmação de *Vibrio parahaemolyticus*.

### 3.1.2.1 Preparo das amostras

Como procedimento preliminar para às referidas análises, eram desinfetadas a câmara asséptica e a área externa da embalagem com álcool 70% para evitar contaminação externa, e ligava-se a luz ultravioleta por 15 minutos. Após o período de tempo, eram retiradas, homogênea, aleatoriamente e de maneira asséptica, 75 g de cada amostra (Fig. 5), sendo transferidas porções de 25 g para três envelopes de polietileno, previamente esterilizados, próprios para o uso em aparelho “Stomacher”® (Seward – Stomacher 80). Esta unidade analítica é preconizada para alimentos com o mínimo de 200 g na embalagem (BRASIL, 2001).



Fig. 5: Retirada asséptica de 75 g de amostra, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 07/08/12.

A primeira das unidades analíticas foi homogeneizada em 225 mL de solução salina peptonada a 0,1% (BRASIL, 2003), a segunda, para realização da pesquisa de *Salmonella* spp., em 225 mL de solução salina peptonada tamponada a 1% (BRASIL, 2003), e a terceira, para análise de *Vibrio parahaemolyticus*, em 225 mL de caldo peptonado sal a 3% (BRASIL, 2003), necessários para obter-se a diluição inicial ( $10^{-1}$ ) com auxílio de “Stomacher”® em velocidade média por um minuto.

As diluições de cada amostra eram realizadas pela transferência de 1 mL da alíquota da diluição inicial homogeneizada, com auxílio de pipeta automática, em tubos, devidamente estéreis e vazados com 9 mL de mesma solução diluente, produzindo a segunda diluição ( $10^{-2}$ ).

As diluições subsequentes eram procedidas da mesma maneira, transferindo 1 mL da diluição anterior homogeneizada, até a sexta diluição ( $10^{-6}$ ) (BRASIL, 2003).

### 3.1.2.2 Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM)

A CBHAM por semeadura em profundidade foi realizada pela inoculação de 1 mL das diluições homogeneizadas em duplicata, com auxílio de pipeta automática, em cada uma das placas de Petri esterilizadas e descartáveis, previamente identificadas com o número de amostra, diluição, tipo de contagem, data e nome do pesquisador. Foram realizadas contagens com as diluições até  $10^{-6}$  (BRASIL, 2003).

Em cada placa de Petri inoculada, era vertido o meio de cultura Ágar Padrão para Contagem (APC) (Merck, cód. 105463) previamente fundido e resfriado à temperatura de 45°C, em quantidade suficiente para cobrir a superfície da placa (18 mL). O inóculo foi homogeneizado com o APC através de movimentos circulares suaves, em formato de oito, por cinco vezes, no sentido horário e anti-horário, sob superfície plana. Após a solidificação do meio, as placas eram invertidas e incubadas em estufa a 35°C (Thermolyne), por 48 horas.

Passado o tempo de incubação, as colônias crescidas eram contadas com auxílio de lupa em contador de colônias tipo Quebec® (Leica). Placas contadas e utilizadas no resultado possuíam entre 25 e 250 UFC/g de amostra, obtendo dessa forma resultados ideais (ibid.) (Fig. 6). Quando encontradas duas placas da mesma diluição com valores ideais de colônias, era feita média aritmética para obtenção do

resultado. No caso de duas diluições diferentes se encontrarem dentro destes valores, multiplicava-se o menor valor encontrado na contagem destas placas por dois. Se o resultado fosse menor que o maior encontrado na contagem das placas ideais, este era o resultado. Sendo maior, era feita média aritmética. O resultado final foi expresso em UFC/g, levando-se em conta a diluição empregada.

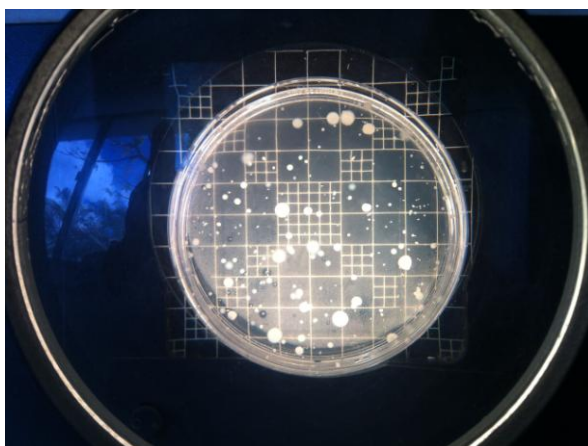


Fig. 6: Placa ideal para CBHAM, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 17/07/12.

### 3.1.2.3 Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas (CBHAP)

A CBHAP foi realizada de maneira semelhante à CBAM. Após a solidificação do meio, as placas foram invertidas e incubadas em geladeira (Electrolux), com temperatura a 7°C, por sete dias (BRASIL, 2003).

Placas contadas e utilizadas no resultado possuíam entre 25 e 250 UFC/g de amostra, obtendo dessa forma resultados ideais (ibid.) (Fig. 7). O resultado final foi expresso em UFC/g, levando-se em conta a diluição empregada.



Fig. 7: Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias psicotróficas, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 22/08/12.

#### 3.1.2.4 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Foi realizada a verificação da presença ou ausência de *Salmonella* spp., considerando a legislação vigente (BRASIL, 2001), que consta ausência da bactéria em alimentos. A detecção é de grande importância por ser causadora de infecção alimentar grave.

Para a pesquisa, foram realizados os seguintes procedimentos: a fase do pré-enriquecimento ou enriquecimento não-seletivo, que foi realizada no preparo das amostras, descrita anteriormente no item 3.1.2.1.

Após o período de incubação de 16 a 20 horas em estufa a 35°C, foi realizada a segunda fase, denominada enriquecimento seletivo, onde transferiu-se 1 mL da diluição 10<sup>-1</sup> para o caldo Mossel (Himedia, cód. M287) e 0,1 mL para caldo Rappaport Vassiliadis (Himedia, cód. M880). Em seguida, o primeiro foi incubado em estufa de 35°C por 24 horas, e o segundo a 41°C por 24 horas. A turvação dos meios, após o período estipulado, indica a etapa como positiva.

A terceira fase é o plaqueamento seletivo. Com o auxílio de uma alça de platina, o inóculo, proveniente dos caldos Rappaport Vassiliadis e Mossel, foi semeado de forma estriada em placas de Petri contendo ágar Rambach (Himedia, cód. M181), Hektoen (Himedia, cód. M467) e Bile Peptona Lactose-Sacarose (BPLS) (Merck, cód. 107232), para posteriormente serem incubadas a 35 a 37°C por 24 horas.

Conforme Brasil (2003), colônias típicas de *Salmonella* spp. em ágar BPLS apresentam-se incolores ou de cor rosada, entre translúcidas a ligeiramente opacas; em ágar Rambach, são de cor vermelha, sendo que alguns sorovares podem possuir coloração rosa claro, cor pêssego ou amarelas; em ágar Hektoen, segundo Costa (2011), as colônias desenvolvidas são transparentes, verde-azuladas, com ou sem o centro preto, podendo ser inteiramente pretas no caso de cepas fortemente produtoras de ácido sulfídrico (Fig. 8).

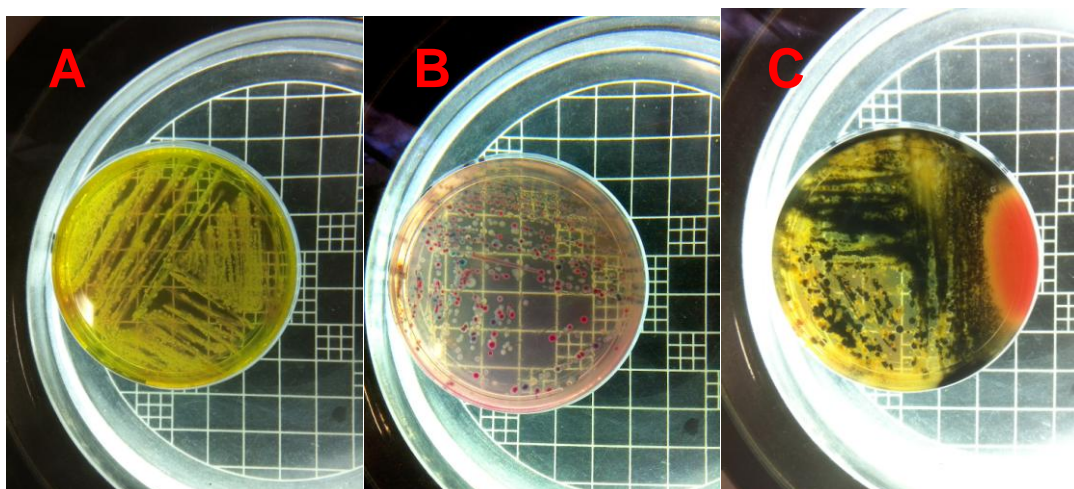


Fig. 8: Colônias típicas de *Salmonella* spp. em meio BPLS (A), meio Rambach (B) e meio Hektoen (C), no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 24/08/12.

A partir de colônias características de *Salmonella* spp. encontradas na fase anterior, após o período de incubação, foi realizada a fase da triagem para diferenciação dos gêneros *Proteus* spp. e *Salmonella* spp. Com auxílio de uma agulha, foi coletada de cada placa de Petri uma colônia típica de *Salmonella* spp., inoculando-a em um tubo contendo o meio Ágar “Triple Sugar Iron” (TSI) (Himedia, cód. M021), através de picada profunda e estriamento na superfície inclinada do bisel, sendo este incubado a 35 a 37°C por 24 horas. Quando ocorre no fundo do

meio uma coloração amarelada intensa, no meio do tubo uma pigmentação preta e a superfície com coloração vermelho cereja, ou quando a base estiver enegrecida e o bisel, de coloração vermelho cereja, considera-se o teste como positivo para *Salmonella* spp. ou *Proteus* spp. (Fig. 9).



Fig. 9: Tubo positivo para *Salmonella* spp. em meio TSI, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 28/07/12.

Após o período de incubação, a partir dos tubos positivos, foi coletado da superfície duas colônias com auxílio de uma agulha, sendo uma inoculada por estriamento em um tubo contendo o meio ágar nutriente (Merck, cód. 105450) e a outra, em um tubo com ágar fenilalanina (Vetec, cód. 5022). Ambos os tubos foram incubados a 35 a 37°C por 24 horas.

Decorrido o tempo de incubação, foi colocado três gotas de solução de cloreto férrico (Merck, cód. 103943) a 10% nos tubos contendo ágar fenilalanina. A alteração da coloração da cultura na superfície do bisel para verde indica reação de desaminação da fenilalanina, sendo que a *Salmonella* spp. não a desamina (Fig. 10). Portanto, em caso de prova negativa, era dado continuidade a prova.



Fig.10: Prova da fenilalanina positiva à direita, e negativa à esquerda, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 28/08/12.

A última etapa da análise é o teste de soroaglutinação para diferenciar *Salmonella* spp. e *Proteus* spp. Para tal, a partir do ágar nutriente previamente inoculado, colocou-se 1 mL de solução salina e, com auxílio de uma alça de platina, foram suspensas as colônias sem romper o meio e retiradas uma gota deste, colocando em uma placa de vidro dividida em pequenos quadrados, previamente lavada com água e sabão dos dois lados e desinfetada com álcool 70%.

Em seguida, foi adicionada uma gota do soro polivalente (Probac do Brasil, cód. 505AP068-E) para *Salmonella* spp. na placa de vidro, realizando movimentos circulares com a placa por dois minutos, sendo procedido então a leitura. A prova positiva caracteriza-se pela presença de aglutinação na mistura do cultivo mais anti-soro, podendo ser observado precipitados brancos (Fig. 11). A ausência de aglutinação determina resultado negativo para a prova (BRASIL, 2003).

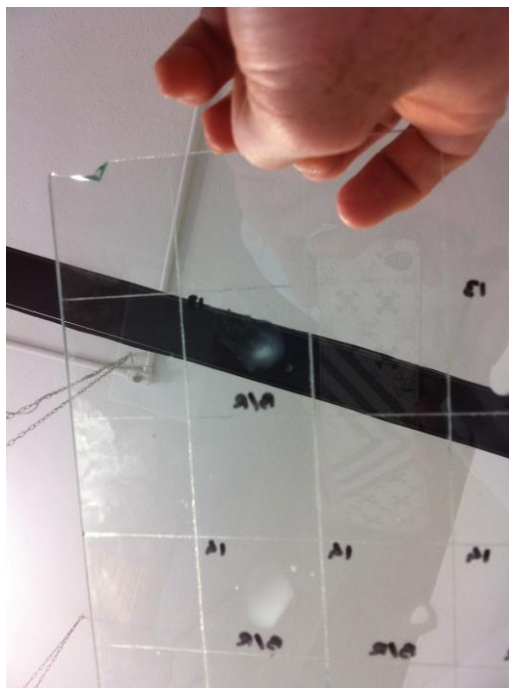


Fig. 11: Prova de soroaglutinação para *Salmonella* spp. com resultado positivo, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 21/08/12.

### 3.1.2.5 Contagem de coliformes termotolerantes

Foi realizada a transferência de 1 mL de cada uma das cinco diluições feitas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ ) para placas de Petri esterilizadas. Em seguida, foi adicionado a cada placa cerca de 1,5 mL de ágar Cristal Violeta Vermelho Neutro Bile com Lactose (VRBL) (Oxoid, cód. CM107B) previamente fundido e mantido entre 46° a 48°C em banho-maria (BRASIL, 2003). Posteriormente, foi realizada a homogeneização, deixando em repouso até total solidificação do meio.

Adicionou-se sobre a primeira camada cerca de 10 mL de VRBL previamente fundido e mantido entre 46°C e 48°C em banho-maria, formando uma segunda camada de meio. Esta sobrecamada visa à prevenção do crescimento e do espraiamento de colônias na superfície do ágar (ibid.).

Esta é a primeira etapa da prova da contagem de coliformes termotolerantes. O VRBL apresenta em sua composição sais biliares e cristal violeta, responsáveis



pela inibição de microrganismos Gram positivos e vermelho neutro, um indicador de pH que revela a fermentação da lactose pelos microrganismos presentes.

Após completa solidificação do meio, as placas foram incubadas em posição invertida em temperatura de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 18 a 24 horas.

Foram selecionadas para contagem placas que continham entre 15 e 150 colônias, contando as que apresentarem morfologia típica de coliformes, ou seja, colônias róseas, com 0,5 a 2 mm de diâmetro, rodeadas ou não por uma zona de precipitação da bile presente no meio (Fig. 12). Os resultados foram expressos em UFC de coliformes/g de amostra.

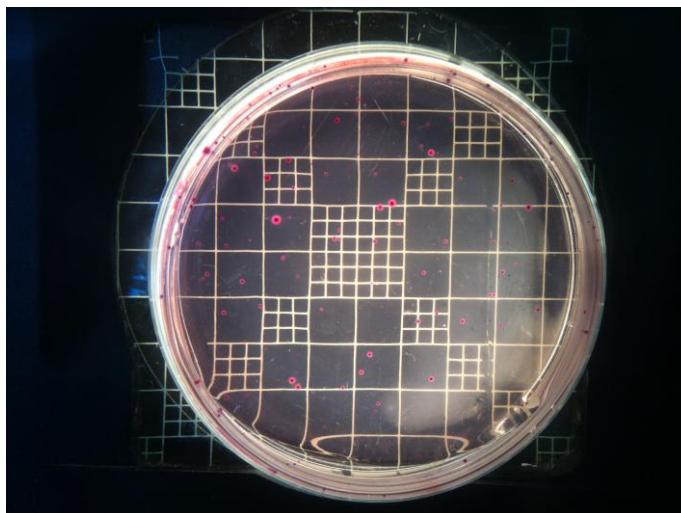


Fig. 12: Colônias típicas de coliformes em placa com meio VRBL, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 25/07/12.

De cada placa contendo colônias típicas, três foram repicadas com auxílio de uma agulha e semeadas em tubos contendo 10 mL de Caldo *Escherichia coli* (EC) (Himedia, cód. M127), incubados em estufa a  $44,5^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$  por 48 horas.

Após o período de incubação, a leitura dos tubos era realizada, sendo considerados positivos os tubos que apresentaram gás no interior do tubo de Durham ou efervescência do meio.

O resultado final foi expresso em UFC/g, levando-se em conta o número de colônias contadas em meio VRBL, o número de colônias confirmadas em caldo EC, o número de colônias repicadas e a diluição utilizada.

### 3.1.2.6 Número Mais Provável de *Vibrio parahaemolyticus*

Segundo Brasil (2003), o ideal é a pesagem de 50g da amostra e adição de 450 mL de caldo peptonado sal (Vetec, cód. 3132) 3%. Porém, por haver pouco meio de cultura disponível para a análise, foi pesado 25g da amostragem e adicionado 225 mL do referido caldo, homogeneizando com auxílio de “Stomacher”® em velocidade média por um minuto para obtenção da diluição inicial ( $10^{-1}$ ), como descrito no item 3.1.2.1.

Na sequência, com auxílio de pipeta automática, foram efetuadas as diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  em caldo peptonado sal a 3%, com posterior inoculação de 1 mL de cada diluição em séries de três tubos contendo 10 mL caldo de enriquecimento seletivo “Glucose Sal Teepol” (GSTB) (Himedia, cód. M621) e incubação em estufa a 35 - 37°C por 24 horas. A leitura dos tubos é baseada na presença de turvação, que indica a suspeita da presença de *Vibrio parahaemolyticus* (Fig. 13).

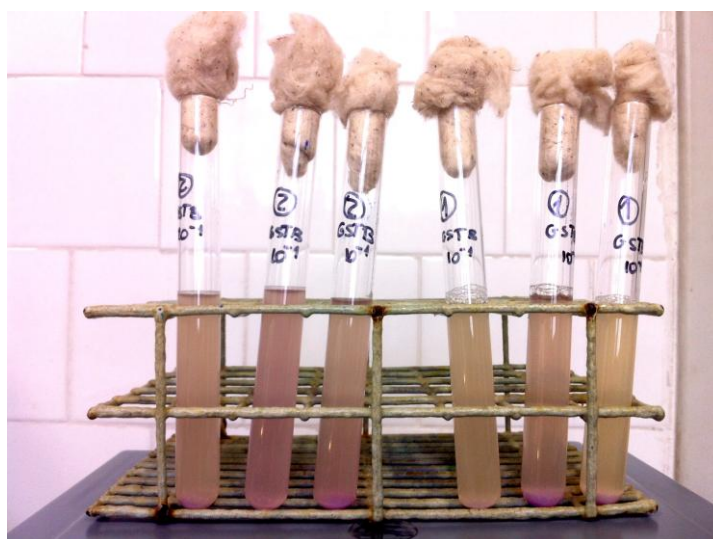


Fig. 13: Tubos com meio GSTB com turvação, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 11/07/12.

Através da combinação de tubos de GSTB com resultado positivo, foi calculado o Número Mais Provável, empregando a tabela de NMP quando se

analisam três tubos por diluição, sendo o resultado expresso em NMP de *Vibrio* spp./g de amostra.

A partir de cada tubo de GSTB que apresentou turvação, sem agitá-lo e com auxílio de uma alça de platina, foi retirada da superfície uma alçada do crescimento, estriando na superfície seca de placas contendo ágar Tiosulfato Citrato Sacarose Sais Biliares (TCBS) (Difco, cód. 265020) (Fig. 14). As placas foram incubadas invertidas em estufa com temperatura de 35 a 37°C por 24 horas para as provas preliminares para a indicação.



Fig. 14: Realização de estriamento em placa contendo TCBS, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 22/08/12.

Após o período de incubação, observou-se o aparecimento de colônias típicas da bactéria, que se apresentam arredondadas, opacas, com coloração azul esverdeada e 2 a 3 mm de diâmetro (Fig. 15). Caso não houvesse colônias suspeitas, o resultado era negativo para o tubo de origem.

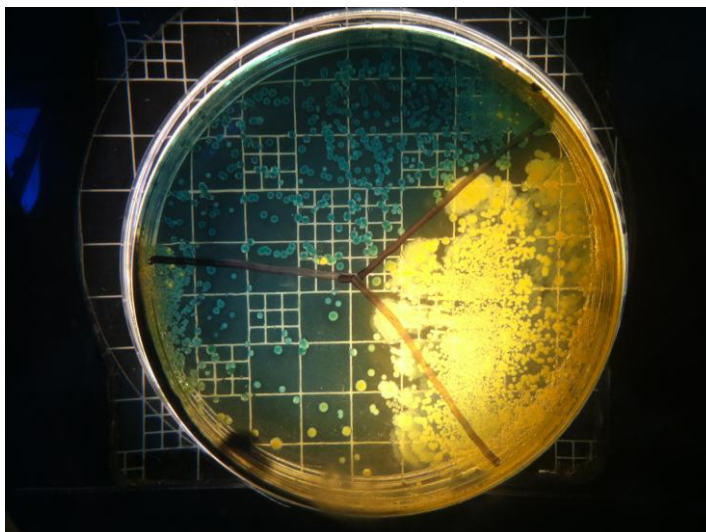


Fig. 15: Colônias típicas de *V. parahaemolyticus* em placa com meio TCBS, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 26/07/12.

De cada placa, foram selecionadas três colônias típicas e transferidas simultaneamente, com auxílio de uma alça de platina, para tubos contendo caldo peptonado sal 3% e ágar nutriente sal 3% inclinado, com incubação em estufa a 35 a 37°C por 24 horas.

Decorrido o tempo previsto, a partir do cultivo mantido em ágar nutriente sal a 3%, com auxílio de uma agulha de platina, foi inoculado em tubos com ágar TSI ("Triple Sugar Iron") sal 3%, mediante picada central em toda profundidade do ágar e estriando a superfície inclinada. Os tubos foram incubados em estufa a temperaturas de 35 a 37°C por 24 horas. O *Vibrio parahaemolyticus* apresenta base ácida, de coloração amarela, e bisel alcalino, avermelhado, sem produção de gás e ácido sulfídrico (Fig. 16).

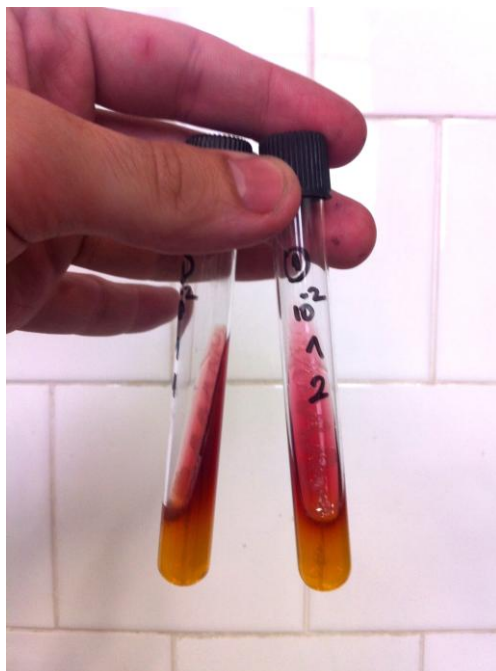


Fig. 16: Tubos com meio TSI, com base ácida e bisel alcalino, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 17/07/12.

A partir dos tubos suspeitos da presença da bactéria, foi realizado esfregaço corado com método de Gram, sendo evidenciado bastonetes retos ou curvos Gram negativos por bacterioscopia por imersão (Fig. 17)

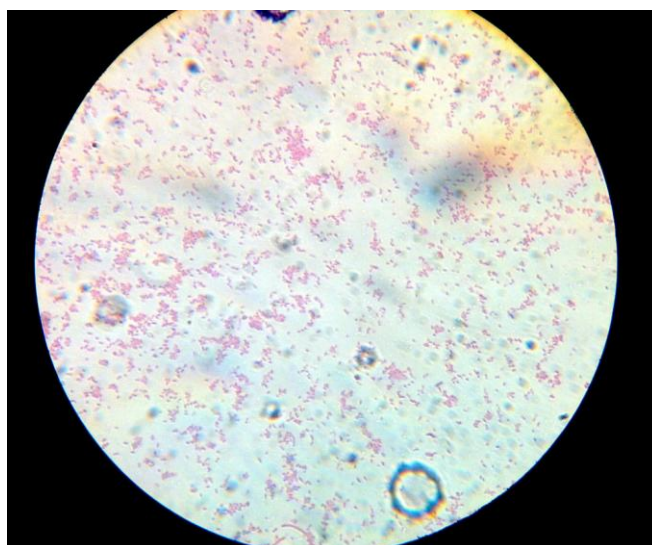


Fig. 17: Esfregaço corado pelo método de Gram, com bastonetes retos e curvos Gram-negativos, oriundo do meio TSI, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 27/08/12.

Provenientes do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, foram realizadas duas provas comparativas de crescimento indicativo da bactéria. Foi transferido, com auxílio de uma alça de platina, uma alçada para um tubo contendo caldo peptonado sem sal e caldo peptonado sal 8% (BRASIL, 2003), assim como foi inoculado em tubos com caldo peptonado sal 6% e 10% (BRASIL, 2003). Todos os tubos foram incubado em estufa a 35 a 37°C por 24 horas.

Conforme Brasil (2003), o *Vibrio parahaemolyticus*, após período de incubação, não cresce no meio sem sal, cresce nos caldos contendo 6% e 8%, e não cresce ou apresenta crescimento discreto a 10% de salinidade.

A partir dos resultados encontrados em todas as provas realizadas, utilizaram-se os tubos suspeitos para realização de testes complementares.

Realizou-se repicagem dos meios ágar nutriente sal 3% e caldo peptonado sal 3% para renovação dos cultivos. A partir das culturas novas em ágar nutriente sal 3%, foram realizadas as provas da oxidase, de Hugh-Leifson glicose (OF), teste de motilidade e cultivo em ágar ferro três açúcares sal 3% (TSI), este último descrito anteriormente.

A prova da oxidase foi realizada com auxílio de uma alça de platina, espalhando a cultura sobre tiras de papel comerciais para teste de oxidase (Laborclin, cód. 670661), sendo feita a leitura em 15 segundos. Com a utilização do reativo N'N'N'N'-tetrametilparafenileno-diamina, o aparecimento de cor azul é indicativo de reação positiva (Fig. 18).

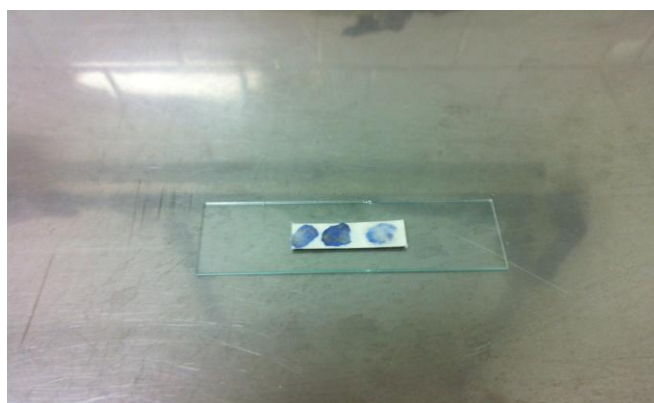


Fig. 18: Aparecimento da cor azul em tiras de prova de oxidase, com resultado positivo para *V. parahaemolyticus*, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 10/10/12.

Na prova de Hugh-Leifson glicose (OF), foi inoculado com auxílio de alça de platina em dois tubos contendo o meio O/F glicose (Merck, cód. 10282) sal 3%, sendo um dos tubos coberto com 2 mL de óleo mineral comercial (Lapon) previamente estéril. Após o período de incubação em estufa a 35 a 37°C por 24 horas, foi verificado a viragem de cor nos meios de verde para amarelo e a presença de gás (Fig. 19). O *Vibrio parahaemolyticus* fermenta a glicose, promovendo a viragem de coloração, sem a produção de gás em ambos os tubos.

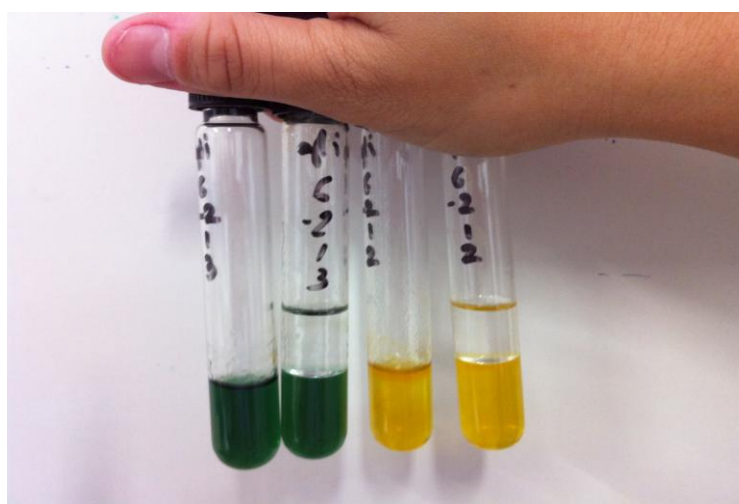


Fig. 19: Tubos com meio O/F glicose sal 3%, sendo os dois da direita antes da inoculação, e os dois da esquerda após incubação, com a viragem de cor, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 10/10/12.

O teste da motilidade foi realizado com auxílio de agulha de platina através de picada central, inoculando em um tubo contendo ágar motilidade (Himedia, cód. M847) sal 3%, com posterior incubação a 35 a 37°C por 24 horas. O crescimento difuso ao redor da picada caracteriza motilidade positiva, característico da bactéria (Fig. 20).

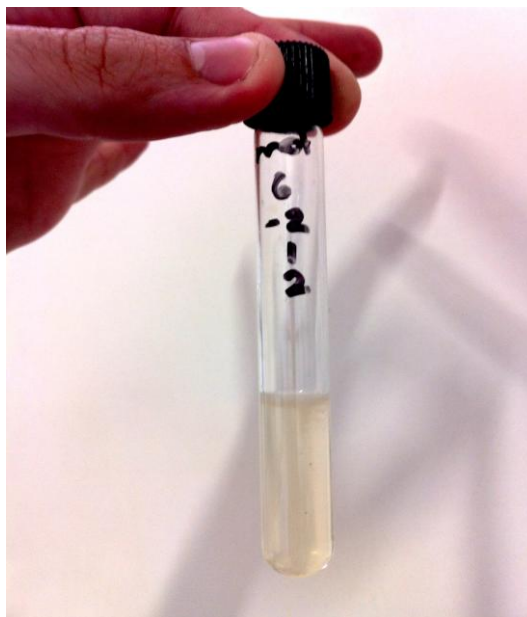


Fig. 20: Tubo com ágar motilidade sal 3%, com crescimento difuso ao redor da picada, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 10/10/12.

A partir das culturas estocadas e reativadas em caldo peptonado sal 3%, foram realizados os seguintes testes: teste do crescimento a 42°C, cultivos em caldo vermelho de fenol sacarose sal 3% e ágar gelatina sal 3%, descarboxilação da lisina, hidrólise da arginina e prova da fermentação do manitol e arabinose.

No teste de crescimento a 42°C, com auxílio de uma alça de platina, foi inoculado em tubo contendo caldo peptonado sal 3% e incubado a 41 a 43°C por 24 horas. O *Vibrio parahaemolyticus* cresce à esta temperatura proposta.

Foi inoculado, com auxílio de alça, uma alçada em tubo contendo caldo vermelho de fenol sacarose (BRASIL, 2003) sal 3%, com posterior cobertura do tubo com 2 mL de óleo mineral comercial estéril e incubação a 35 a 37°C por 24 horas. Caso haja a fermentação da sacarose e produção de gás, ocorre a mudança de coloração do meio de vermelho para amarelo, o que não é característico da bactéria pela não capacidade de fermentação da sacarose.

No crescimento em ágar gelatina (Isofar, cód. 726) sal 3%, foi inoculado, com auxílio de alça de platina, uma alçada em tubo contendo ágar gelatina sal 3%, sendo incubado a 35 a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, os tubos foram resfriados para facilitar a leitura, baseada no aparecimento de um halo opaco ao



redor do crescimento, indicativo da presença de gelatinase. O *Vibrio parahaemolyticus* é gelatinase positiva.

Nas provas de descarboxilação da lisina e hidrólise da arginina, inoculou-se uma alçada, com auxílio de alça de platina, em tubos contendo caldo vermelho de fenol lisina sal 3% e caldo arginina sal 3% (BRASIL, 2003), respectivamente. Foi inoculado também, em ambas as provas, em um tubo contendo o meio base, sem a adição do aminoácido correspondente, servindo de controle. Os tubos foram cobertos com 2 mL de óleo mineral comercial estéril e incubados a 35 a 37°C por 4 dias, juntamente com tubos contendo os dois caldos não inoculados, servindo de controle negativo. Os tubos foram examinados todos os dias, verificando alteração na coloração dos meios.

Em ambas as provas, durante o período de incubação, a cor dos meios passa para amarela devido à fermentação da glicose e, ocorrendo a descarboxilação da lisina e hidrólise da arginina, os meios retornam a cor púrpura pela produção de aminas primárias e dióxido de carbono. Os tubos controles, sem os respectivos aminoácidos, devem virar para amarelo e assim permanecer. O *Vibrio parahaemolyticus* descarboxila a lisina e não hidrolisa a arginina.

A prova da fermentação do manitol e arabinose, utilizando uma alça de platina, inoculou-se uma alçada em um tubo contendo caldo vermelho de fenol manitol sal 3% e outro com caldo vermelho de fenol arabinose sal 3% (BRASIL, 2003). Os tubos, após cobertos com 2 mL de óleo mineral comercial estéril, foram incubados em estufa a temperatura de 35 a 37°C por 24 horas. Com a fermentação dos açúcares e consequente produção de ácido, ocorre a viragem de cor nos meios de vermelho para amarelo. Conforme Brasil (2003), 99% das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* fermenta o manitol e 50%, a arabinose.

Foram considerados como positivos as amostras que apresentaram resultados compatíveis com as características próprias de *Vibrio parahaemolyticus*, segundo quadro 4.

Quadro 4: Resultados característicos de *V. parahaemolyticus* nas provas adicionais de identificação.

Provas	Resultados característicos da bactéria
Motilidade	Positivo
Hugh Leifson (OF)	Glicose fermentativo
Descarboxilação da lisina	Positivo
Hidrólise da arginina	Negativo
Crescimento a 42°C	Positivo
Fermentação do manitol	Positivo
Fermentação da arabinose	Positivo
Agar gelatina sal 3%	Crescimento com formação de halo
Halofilismo (6% sal)	Positivo
Halofilismo (8% sal)	Positivo
Halofilismo (10% sal)	Negativo ou crescimento discreto

### 3.1.2.7 Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva

Utilizando as diluições seriadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ , foi transferido 0,1 mL de cada para as respectivas placas de Petri em duplicata contendo o meio de cultura Baird-Parker (Himedia, cód. M043), previamente plaqueado e solidificado. Com o auxílio de bastão do tipo “hockey” previamente flambado, o inóculo foi espalhado por toda placa, com base na técnica denominada “spread plate” ou espalhamento, sempre no sentido horizontal e vertical da mesma. As placas foram incubadas invertidas na estufa a uma temperatura de 35 a 37°C por 48 horas.

Após o período de incubação, foram selecionadas placas de 20 a 200 colônias e feita a contagem com auxílio de lupa em contador de colônias tipo Quebec®. O resultado foi expresso em UFC de *Staphylococcus* spp. por grama de amostra. De acordo com Brasil (2003) colônias típicas de *Staphylococcus aureus* são pretas brilhantes com anel opaco, rodeadas por um halo claro, transparente e destacado sobre a opacidade do meio (Fig. 21). As atípicas possuem coloração acinzentadas ou pretas brilhantes, sem halo ou com apenas um dos halos. A coloração preta se deve à redução do telurito de potássio em telúrio metálico, e o halo é formado pela produção da enzima lipovitelinase, que hidrolisa a lipovitelina, presente na emulsão de gema de ovo. Tanto o telurito de potássio, como a emulsão de gema de ovo são componentes do meio utilizado, assim como também o cloreto de lítio e glicina, inibidores da microbiota acompanhante e piruvato, que promove reparação celular e redução de  $H_2O_2$ .

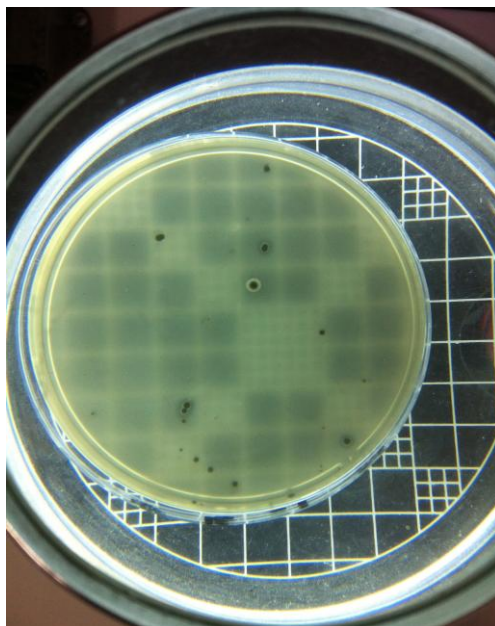


Fig. 21: Colônia típica de *S. coagulase* positiva em placa com meio Baird-Parker, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 23/08/12.

Em seguida, foram selecionadas três colônias típicas e transferidas, com o auxílio de uma alça de platina previamente flambada, para três tubos de ensaio distintos contendo caldo “Brain Heart Infusion” (BHI) (Himedia, cód. M210), promovendo a incubação em uma estufa a temperatura de 36°C por 24 horas.

Decorrido o tempo de incubação, a partir do crescimento nos tubos contendo caldo BHI, observado por turvação, foi realizada a coloração de Gram. Com auxílio de uma alça de platina, preparou-se esfregaço, sendo corado pelo método de Gram. Observando em microscópio óptico com imersão, a presença de cocos Gram positivos indica a necessidade da realização de testes complementares.

Para confirmação, realizou-se a prova da coagulase e da catalase. A prova da coagulase é baseada na capacidade de coagular o plasma de coelho pela ação da enzima coagulase produzida pela bactéria. O processo ocorre devido à transformação do fibrinogênio em fibrina, depositada no fundo do tubo de ensaio. Logo, foram inoculados 0,2 mL provenientes do crescimento em BHI e 0,2 mL de plasma liofilizado de coelho (Newprov, cód. 1019) em um tubo de ensaio previamente esterilizado, com posterior incubação em uma estufa a 35 a 37°C por 24 horas. Após o tempo estipulado, verificou-se a presença de coágulos no fundo do tubo. Estes se classificam de acordo com o grau de coagulação, considerando:

reação negativa não há formação de coágulos; uma cruz, quando há um coágulo pequeno e desorganizado; duas cruzes, quando o coágulo é pequeno e organizado; três cruzes, formação de coágulo grande e organizado; e quatro cruzes, quando ocorre coagulação de todo o conteúdo do tubo, que não se desprenderá quando o tubo for invertido (Fig.22).



Fig. 22: Resultado positivo de três cruzes na prova da coagulase, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 18/08/12.

A prova é considerada positiva para *Staphylococcus aureus* quando a reação de coagulação for do tipo três ou quatro cruzes. Em caso de reação negativa, a prova é dada como negativa. E quando for dos tipos uma e duas cruzes, deve ser repetido o procedimento a partir do caldo BHI.

A prova da catalase é baseada na produção da enzima catalase pela bactéria, capaz de romper as ligações do peróxido de hidrogênio (Hemafarma), liberando oxigênio e água, o que se evidenciava por meio da formação de bolhas de efervescência. Portanto, a partir da cultura no caldo BHI, semeou-se uma alíquota para um tubo contendo ágar nutriente, com auxílio de uma alça de platina, sendo incubado em estufa a 35 a 37°C por 24 horas. Após este período, foram adicionadas

ao tubo três gotas de água oxigenada. A formação de borbulhas indica prova positiva para catalase (Fig. 23).



Fig. 23: Formação de borbulhas em prova da catalase positiva, no Laboratório de Controle Microbiológico de POA, UFF, 25/08/12.

### 3.1.3 Análise sensorial

Os testes de aceitação e preferência foram aplicados como parte do projeto “Análise sensorial de alimentos e bebidas”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina / Hospital Universitário Antônio Pedro – CEP CMM/HUAP nº 066/07 – CAAE nº 0054.0.258.000-07.

Todos os voluntários receberam e assinaram previamente um termo de consentimento livre e esclarecido (Fig. 24), garantindo a sua aceitação para participar dos testes.

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado para participar da pesquisa "Análise sensorial do file de cação" e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

O objetivo deste estudo é analisar as características sensoriais do file de cação. Sua participação nesta pesquisa consistirá em degustar os files e opinar quanto você gostou ou desgostou das mostras. Quanto aos riscos é importante saber que na elaboração das amostras foram levada em consideração as boas práticas de preparação. Após a elaboração para evitar risco de contaminação foram tomadas providências de padrão de higiene. As amostras foram armazenadas em condições adequadas, evitando a deterioração e possíveis alterações das características sensoriais

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Somente será utilizada sua idade e sexo. Neste termo consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Prof.<sup>a</sup> responsável: Shizuko Kajishima.

Departamento de Nutrição Dietética – Faculdade de Nutrição Emília de Jesus Ferreiro – UFF Rua Mário Santos Braga Nº 30 – 4º andar – Valonguicoba – Niterói – [shinje@uol.com.br](mailto:shinje@uol.com.br) – tel. 2629-9850.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefício de minha participação na pesquisa e concordo em participar. O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFF, que funciona na Pró-reitoria de pós-graduação e Pesquisa da Universidade Federal Fluminense – Rua Miguel de Frias Nº 9 , Icaraí – Niterói.

Local e Data:

Nome:

Assinatura:

Fig. 24: Termo de consentimento livre e esclarecido. Material cedido pela Prof.<sup>a</sup>. Shuzuko Kajishima, UFF, 2012.

### 3.1.3.1 Caracterização dos provadores

Os testes foram realizados com provadores não treinados, estudantes e funcionários da UFF, de ambos os sexos com idades entre 19 a 57 anos.

### 3.1.3.2 Preparo das amostras

Para realização de testes sensoriais, as amostras foram retiradas do freezer do Laboratório de Aquicultura da Faculdade de Veterinária da UFF, acondicionadas em caixas de poliestireno expandido com gelo e transportadas ao Laboratório de Análise Sensorial da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal Fluminense (UFF), onde a análise sensorial foi realizada sob orientação da Prof. Shizuko Kajishima, nas datas de 27 de novembro e 11 de dezembro de 2012.

No primeiro dia da análise sensorial, foram avaliadas cinco amostras (amostra 1, 2, 3, 5 e 7) e no segundo, quatro (amostras 9, 11, 15 e 16). As demais amostras (4, 6, 8, 10, 12, 13 e 17), de acordo com os resultados microbiológicos, apresentaram a bactéria *Salmonella* spp., capaz de causar agravos à saúde dos provadores e foram descartadas. A amostra 14 seria avaliada no segundo dia de análise, porém, ao ser descongelada, não estava de acordo com as características sensoriais de coloração e odor da carne de cação (Fig. 25), sendo então também descartada.

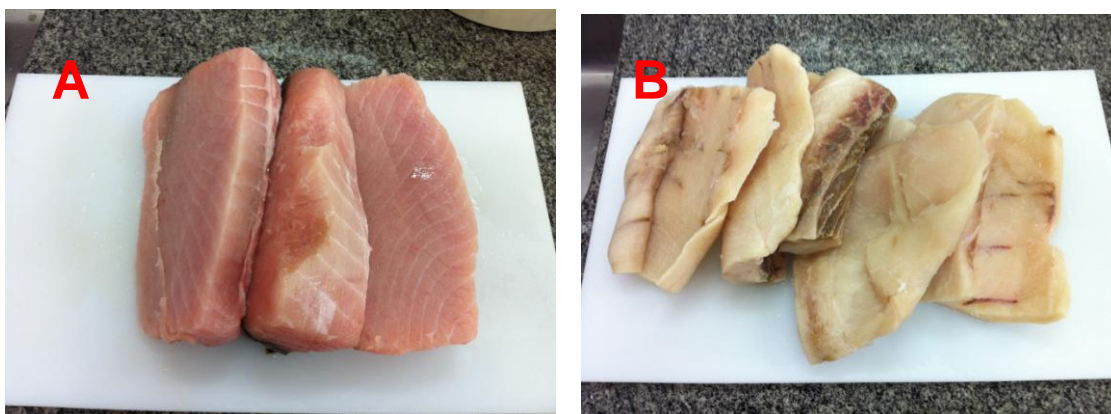


Fig. 25: (A) Amostra 15, com coloração característica da carne do cação; (B) Amostra 14, com coloração não condizente à carne de cação, Laboratório de Análise Sensorial, UFF, 11/12/12.

No dia anterior às análises, as amostras foram retiradas do freezer e acondicionadas em geladeira para descongelamento “overnight”. Nos respectivos dias de análise, na matéria-prima foi realizada a pesagem, lavagem e limpeza e, com auxílio de uma faca previamente esterilizada, cortou-se uniformemente e cada

amostra pesava aproximadamente 20 g cada (Fig. 26 e 27) As amostras foram preparadas utilizando a ficha técnica (Fig. 28).



Fig. 26: Filé de cação lavado antes do corte, Laboratório de Análise Sensorial, UFF, 11/12/12.



Fig. 27: Filé de cação cortado uniformemente, pesando aproximadamente 20 g cada, Laboratório de Análise Sensorial, UFF, 11/12/12.




 <b>FACULDADE DE NUTRIÇÃO</b> <b>SETOR DE CIÊNCIA DOS ALIMENTOS</b> <b>LABORATÓRIO DE ALIMENTOS E DIETÉTICA</b>				
<b>FICHA TÉCNICA</b>		Tema:.		
DE		Preparação: File de Cação		
<b>PREPARAÇÃO</b>		Nº clientes:		
Ingredientes	PC	F.C.	PCB	Medida caseira
Cação	100g	1,1	101g	
Suco de limão	2mL	2	4g	
Sal	0,5		0,5g	
Óleo	1mL		1mL	
<b>Técnica de Preparo</b>				
1- Lavar, limpar e cortar o file de cação.				
2 - Espremer o limão.				
3 -Temperar o cação com sal e suco de limão				
4- Colocar na panela camada o file de cação.				
5 -.Regar com óleo.				
6- Cozinhar em fogo brando por 10 minutos.				
Fator térmico:				
Porção:				
Medida Caseira:				

Fig. 28: Ficha técnica de preparação. Material cedido pela Prof<sup>a</sup>. Shuzuko Kajishima, UFF, 2012.

### 3.1.3.3 Condições dos testes

Os testes de aceitação e preferência foram realizados segundo metodologia de Dutcosky (2011) no Laboratório de Análise Sensorial da Faculdade de Nutrição Emília de Jesus Ferreiro da Universidade Federal Fluminense (UFF), em cabines individuais, sob a luz branca e em temperatura ambiente.

Foi oferecida água mineral entre os intervalos das amostras, à temperatura ambiente, em copo descartável branco de 200mL, e biscoito tipo água, com o intuito de anular o “flavor” residual (MONTEIRO, 1984). Cada provador recebeu dois chocolates tipo “Bis” ao final da análise (Fig 29).

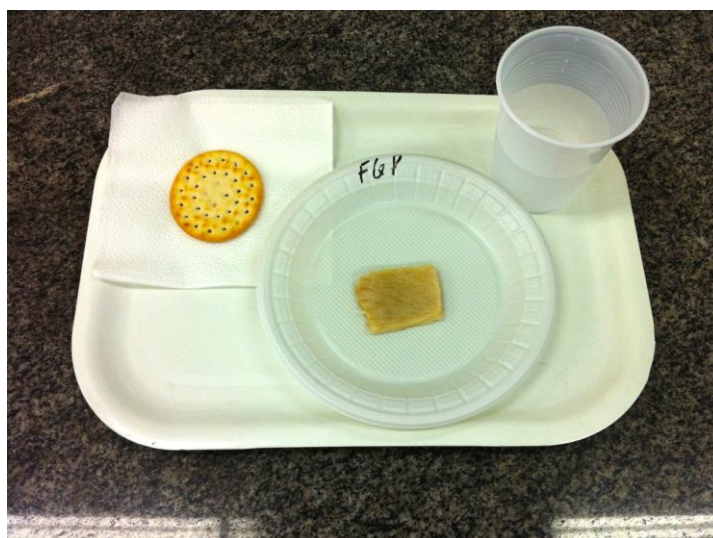


Fig. 29: Apresentação da amostra, oferecida juntamente com copo de água mineral e biscoito tipo água, Laboratório de Análise Sensorial, UFF, 2012.

#### 3.1.3.4 Testes de aceitação e preferência

Participaram dos testes 45 provadores, que avaliaram as amostras utilizando escala hedônica de sete pontos (1= desgostei muito; 2= desgostei moderadamente; 3= desgostei ligeiramente; 4= não gostei nem desgostei; 5= gostei ligeiramente; 6= gostei moderadamente; 7= gostei muito). Os atributos avaliados foram aparência, aroma, sabor e textura, e avaliação global das amostras. Foi avaliada, também, sobre a intenção de compra das amostras (Fig. 30).

Nome: _____ Data: _____ Idade: _____
Amostra:
7. Gostei muito
6. Gostei moderadamente
5. Gostei ligeiramente
4. Não gostei e nem desgostei
3. Desgostei ligeiramente
2. Desgostei moderadamente
1. Desgostei muito
<b>DE ACORDO COM A ESCALA ACIMA RESPONDA:</b>
☞ Por favor, olhe o cação e marque a sua opinião em relação à <b>cor</b> . Nota _____
☞ Por favor, agora cheire o cação e marque ao <b>aroma</b> . Nota _____
☞ Agora, por favor, prove o cação e marque ao <b>sabor</b> . Nota _____
☞ Agora, por favor, prove de novo o cação e marque a <b>textura</b> . Nota _____
Agora, marque a sua opinião em relação ao cação? Nota _____
<b>VOCÊ COMPRARIA ESSE PRODUTO?</b>
( ) Sim            ( ) Não            ( ) Talvez

Fig. 30: Ficha de teste de preferência e aceitação. Material cedido pela Prof<sup>a</sup>. Shuzuko Kajishima, UFF, 2012.

Os provadores receberam as amostras servidas em pratos descartáveis, e codificadas com três letras aleatórias (FOOD DESIGN, 1998). A ordem de apresentação das amostras foi balanceada de acordo com Macfie et al. (1989). As amostras foram apresentadas monodicamente.

### 3.1.4 Análise estatística

No presente trabalho, a análise estatística das análises bacteriológicas foi realizada pela Prof<sup>a</sup>. Ana Beatriz Monteiro Fonseca, e a referente à análise sensorial, pela Prof<sup>a</sup>. Shizuko Kajishima.

Em relação às análises bacteriológicas, a descrição estatística dos dados está apresentada por meios paramétricos (média, desvio padrão, valores máximo e mínimo, e intervalo interquartilico) e meios gráficos (diagrama de caixa e hastes e gráficos em pizza).

A análise da normalidade dos dados foi realizada pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando os dados se apresentarem pareados, foram utilizados o teste não paramétrico de Friedman e o teste de Wilcoxon para comparações múltiplas.

Todas as decisões estatísticas foram tomadas ao nível de significância de 0,05 (5%).

Quanto aos testes sensoriais, a partir dos resultados obtidos pelo método da escala hedônica, as categorias descritivas foram transformadas nos valores numéricos correspondentes.

Para o teste de aceitação, as amostras foram consideradas aceitas se 70% dos provadores atribuísem nota  $\geq 4$ . No teste de preferência, para obter a significância, os resultados obtidos foram tratados estatisticamente através de análises de variância (ANOVA). Para a comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, são apresentados os resultados encontrados nas análises bacteriológicas e sensorial e as referidas discussões.

### 4.1 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

A Resolução RDC nº 12 da ANVISA (BRASIL, 2001) consta para a matriz alimentícia pescado *in natura*, resfriado ou congelado, não consumido cru, os padrões de limite de crescimento para *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* spp.

Apesar da legislação brasileira não possuir os padrões para este tipo de produto no que se refere a bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e bactérias heterotróficas aeróbias psicotróficas, coliformes termotolerantes e *Vibrio parahaemolyticus*, tais análises foram realizadas pois a presença das bactérias indica as condições higiênico-sanitárias do pescado.

Portanto, para tais análises, foram utilizadas como comparação legislações microbiológicas internacionais da África do Sul (2000), Hong Kong (2001), Japão (FAO, 2005) e Nova Zelândia (1995), além de Huss (1997) e ICMSF (1986).

Considerando-se que no extenso levantamento bibliográfico efetuado para a pesquisa e não sendo encontradas pesquisas anteriores na área de bacteriologia referentes à matriz alimentícia (cação Anequim), a discussão foi efetuada em comparação com dados encontrados para outras espécies de pescado, conforme consta no anexo I, item 2 (BRASIL, 2001), onde há a citação de que no caso da análise de produtos não caracterizados nas tabelas específicas do anexo, considera-se a similaridade de natureza e processamento do produto como base para seu enquadramento nos padrões estabelecidos para um produto similar.

#### 4.1.1 Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas e Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas

Os resultados obtidos para a CBHAM e CBHAP são observados na tabela 1.

Tabela 1: Resultados obtidos em UFC/g na CBHAM e CBHAP.

<b>Amostra</b>	<b>Resultados obtidos (CBHAM)</b>	<b>Resultados obtidos (CBHAP)</b>
<b>1</b>	$1,39 \times 10^6$	$2,32 \times 10^7$
<b>2</b>	$1,25 \times 10^6$	$6,00 \times 10^6$
<b>3</b>	$2,15 \times 10^6$	$2,91 \times 10^7$
<b>4</b>	$1,08 \times 10^7$	$6,40 \times 10^5$
<b>5</b>	$7,80 \times 10^6$	$7,65 \times 10^7$
<b>6</b>	$9,40 \times 10^6$	$1,58 \times 10^7$
<b>7</b>	$1,50 \times 10^4$	$1,10 \times 10^7$
<b>8</b>	$1,33 \times 10^5$	$2,66 \times 10^7$
<b>9</b>	$1,82 \times 10^5$	$4,15 \times 10^6$
<b>10</b>	$6,20 \times 10^4$	$7,80 \times 10^6$
<b>11</b>	$4,10 \times 10^5$	$6,05 \times 10^6$
<b>12</b>	$6,70 \times 10^4$	$1,23 \times 10^6$
<b>13</b>	$2,07 \times 10^5$	$6,70 \times 10^6$
<b>14</b>	$1,40 \times 10^7$	$5,00 \times 10^7$
<b>15</b>	$2,19 \times 10^6$	$3,80 \times 10^7$
<b>16</b>	$2,36 \times 10^4$	$6,05 \times 10^5$
<b>17</b>	$2,90 \times 10^5$	$6,55 \times 10^5$

Na legislação vigente brasileira (BRASIL, 2001) não consta limites máximos de crescimento para as análises de CBHAM e CBHAP. Para tais, usa-se como referência o ICMSF (1986), que estipula o limite de  $10^7$  UFC/g<sup>-1</sup>.

Conforme os resultados obtidos em relação à contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, pode-se observar que as amostras apresentaram valores entre  $1,50 \times 10^4$  a  $1,40 \times 10^7$  UFC/g, com média de 5,75 UFC/g. O intervalo

de confiança (95%) foi de 5,27, com desvio padrão de 0,94. A Fig. 31 consta a distribuição da CBHAM.

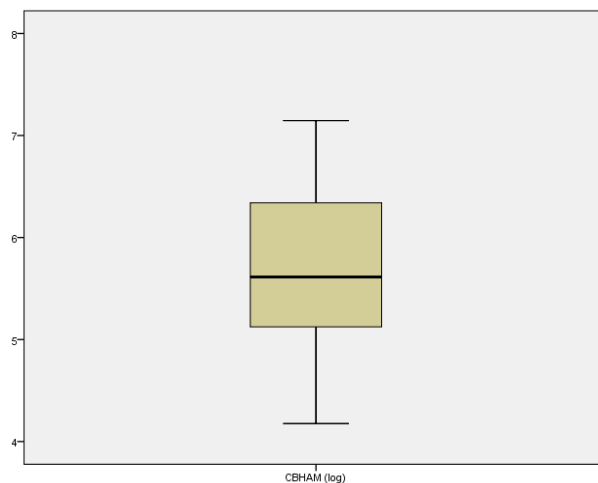


Fig. 31: Distribuição da CBHAM pelas amostras em diagrama de caixa (“block spot”).

Na contagem de bactérias heterotróficas aeróbias psicotróficas, as variações foram de  $6,05 \times 10^5$  a  $7,65 \times 10^7$ . A média encontrada entre as amostras foi de 6,88 UFC/g, com intervalo de confiança (95%) de 6,53 e desvio padrão de 0,67 (Fig. 32).

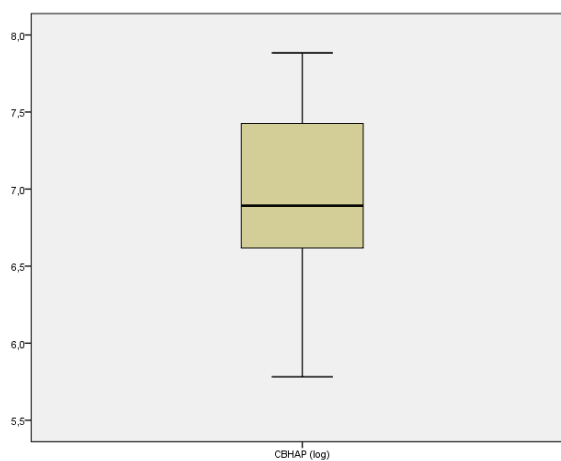


Fig. 32: Distribuição da CBHAP pelas amostras em diagrama de caixa (“block spot”).

Portanto, pode-se dizer que os valores encontrados foram elevados, porém todas as amostras encontraram-se dentro do padrão internacional estipulado.

Comparativamente, na África do Sul, a partir do limite de  $10^6$  UFC/g de amostra na CBHAM, pode-se afirmar que as amostras 4 e 14 estavam acima do padrão estabelecido (ÁFRICA DO SUL, 2000).

Segundo legislação neozelandesa (NOVA ZELÂNDIA, 1995), em relação ao limite de  $10^6$  UFC/g para microrganismos mesófilos, as amostras 4 e 14 são consideradas com qualidade higiênico-sanitárias inferiores.

Nas legislações de Hong Kong (2001) e Japão (FAO, 2005), não há padrão estipulado para CBHAM e CBHAP em pescado fresco não destinado a consumo cru.

No presente estudo, onde obteve-se variações pertinentes aos padrões internacionais (ICMSF, 1986) nas amostras frescas, corrobora com outros encontrados em literatura. Martins (2011) constatou que todos elementos amostrais de pescada apresentaram resultados dentro dos limites preconizados em relação aos microrganismos mesófilos. Andrade (2006) encontrou 3,76 log UFC na CBHAM e 5,13 log UFC na CBHAP em exemplares de atum sem pele. Dams et al. (1996) também encontraram valores conforme o padrão estipulado por ICMSF (1986) em análises de CBHAM e CBHAP da pescadinha.

Entretanto, no presente trabalho ocorreram valores discrepantes de outros estudos, onde foram encontrados valores acima do preconizado por ICMSF (1986). Martins (2011) encontrou 25% das amostras de pescada acima dos limites estipulados por ICMSF (1986) em relação à CBHAP. No estudo de Barreto et al. (2012), a quantificação de mesófilos foi bastante elevada nas amostras frescas de pescado comercializado em mercados, acima do padrão internacional. Haida e Muller (1984) encontraram altas concentrações de mesófilos e psicotróficos em análise de sardinha.

Silva (2010) obteve um crescimento na CBHAM de  $4,61 \log \text{UFC.g}^{-1}$  e  $4,09 \log \text{UFC.g}^{-1}$  em amostras de sardinhas verdadeiras e sardinhas boca-torta, no dia 0 de estocagem, atingindo o limite de  $7 \log \text{UFC.g}^{-1}$  preconizado pela legislação internacional (ICMSF, 1986) no 14º dia de estocagem nas amostras estudadas. No presente estudo, foram encontrados resultados diferentes de Silva (2010), pois, na análise das amostras de filé de cação, obteve-se valores dentro dos padrões, porém mais altos inicialmente, com variações de  $10^4$  a  $10^7$  UFC/g de amostra.



No mesmo estudo, Silva (2010) relatou que, na CBHAP, foi encontrado inicialmente  $4,25 \log \text{ UFC.g}^{-1}$  e  $4,26 \log \text{ UFC.g}^{-1}$  nas amostras de sardinha verdadeira e sardinha boca-torta, respectivamente, alcançando o limite máximo previsto na legislação no 8º dia de estocagem ( $7,66 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ ) nas amostras de sardinha verdadeira e no 6º dia ( $7,17 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ ) nas amostras de sardinha boca-torta. Novamente, o presente estudo não está em conformidade com Silva (2010), pois foram detectados variações iniciais superiores, na ordem de  $10^5$  e  $10^7 \text{ UFC/g}$  de amostra.

#### 4.1.2 *Salmonella* spp.

Identificaram-se sete amostras (41,2%) apresentando presença de *Salmonella* spp. no presente trabalho (Fig. 33). O padrão da legislação brasileira (BRASIL, 2001) é ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de amostra. Portanto, as amostras 4, 6, 8, 10, 12, 13 e 17 foram consideradas fora dos padrões e impróprias para consumo pelo isolamento da bactéria.

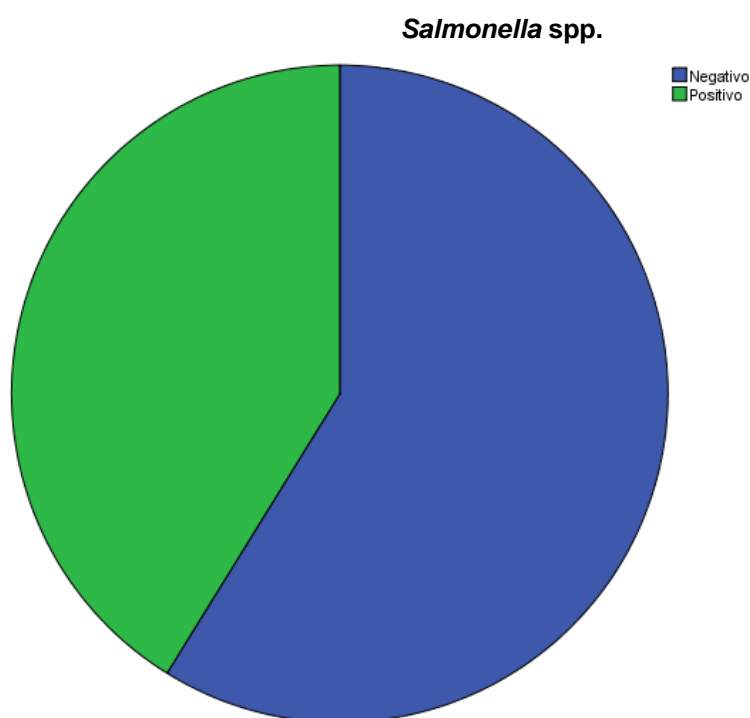


Fig. 33: Gráfico constando as amostras que apresentaram resultado positivo para *Salmonella* spp.

Huss (1997) considerou como dose infectante mínimas concentrações maiores que  $10^2$  UFC/g de amostra analisada. Este valor está acima do preconizado pela legislação brasileira, onde consta que a *Salmonella* spp. esteja ausente. Por isso, a metodologia de análise foi a de isolamento e não contagem.

Os resultados da presente pesquisa foram similares ao de outros autores pelo isolamento da bactéria nas matrizes analisadas, embora em percentuais diferentes. Dams et. al (1996) obtiveram presença de *Salmonella* spp. em 20% das amostras inteiras *in natura* de pescadinha. Youssef et al. (1992) verificaram em tilápias a presença da bactéria em 3,9% das amostras.

Álvares et al. (2008) encontraram a *Salmonella* spp. em 36,4% das amostras de pescado comercializado na grande São Paulo. Liuson (2003) relatou resultados positivos para a bactéria em 7,8% das amostras estudadas de tilápia. Lobo (2009) também obteve resultados positivos em 83,3% das amostras de seu estudo com pescado fresco comercializado em mercados.

Entretanto, Damasceno (2009) não encontrou resultados positivos para *Salmonella* spp em amostras de salmão. Martins (2011) obteve resultados negativos em todos os elementos amostrais de pescada (100%) em relação à *Salmonella* spp. Os dados ora apresentados são contrários aos autores em epígrafe, pois de 17 amostras de filé de cação, foram verificados sete com a presença da bactéria.

Das sete colônias de *Salmonella* spp. encontradas, duas foram provenientes do enriquecimento por caldo Mossel e isolamento no meio BLPS (11,8%) (amostras 4 e 6), duas do caldo Rappaport Vassiliadis e meio Rambach (11,8%) (amostra 12 e 17), duas do caldo Rappaport Vassiliadis e meio BPLS (11,8%) (amostra 10 e 13) e e uma do caldo Mossel e meio Rambach (5,9%) (amostra 8).

#### 4.1.3 Coliformes termotolerantes

Os resultados de coliformes contabilizados em ágar VRBL variaram das grandezas de  $9,80 \times 10^2$  a  $1,71 \times 10^5$  UFC/g de amostra, conforme tabela 2.

Tabela 2: Resultados obtidos em UFC/g em ágar VRBL.

<b>Amostra</b>	<b>Resultados obtidos (Contagem em VRBL)</b>
<b>1</b>	$1,62 \times 10^3$
<b>2</b>	$2,40 \times 10^4$
<b>3</b>	$3,80 \times 10^4$
<b>4</b>	$1,71 \times 10^5$
<b>5</b>	$7,40 \times 10^4$
<b>6</b>	$6,20 \times 10^4$
<b>7</b>	$1,47 \times 10^4$
<b>8</b>	$1,28 \times 10^4$
<b>9</b>	$9,80 \times 10^2$
<b>10</b>	$2,08 \times 10^4$
<b>11</b>	$9,20 \times 10^4$
<b>12</b>	$1,00 \times 10^3$
<b>13</b>	$1,22 \times 10^4$
<b>14</b>	$6,90 \times 10^4$
<b>15</b>	$2,09 \times 10^4$
<b>16</b>	$2,00 \times 10^3$
<b>17</b>	$5,70 \times 10^4$

A média encontrada na contagem de coliformes foi de 4,23, apresentando desvio padrão de 0,71 e intervalo de confiança (95%) de 3,86. As amostras 9 e 12 encontravam-se abaixo do padrão por apresentarem valores inferiores. O gráfico a seguir consta a distribuição da contagem de coliformes (Fig. 34).

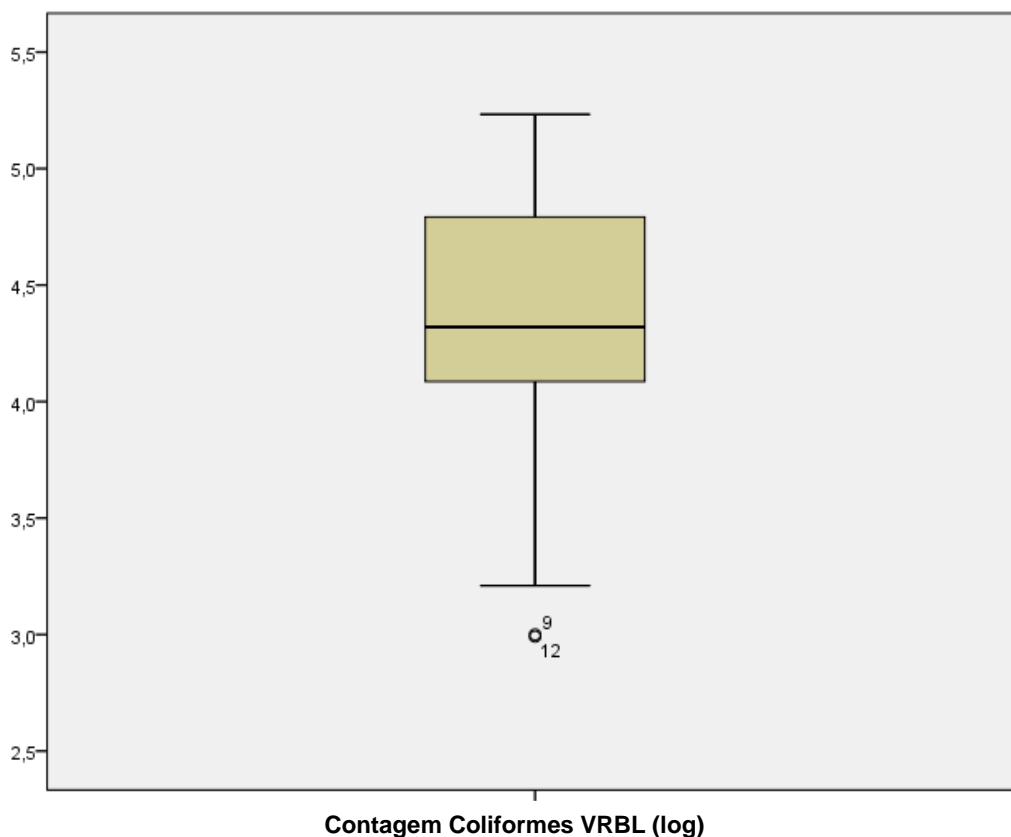


Fig. 34: Distribuição da contagem de coliformes em diagrama de caixa ("block spot"). As amostras 9 e 12 encontram-se fora do padrão estipulado.

Quanto aos coliformes termotolerantes, predominou-se a ausência nas amostras (94,1%), com exceção da amostra 3 (5,9%), na qual foi encontrado resultado de  $1,33 \times 10^4$  UFC/g.

Relacionando os resultados encontrados na contagem em ágar VRBL com os confirmados em caldo EC, sugere-se que bactérias fermentaram a lactose do meio, produzindo ácido, o qual precipitou os sais biliares, absorvendo o vermelho neutro e formando colônias vermelhas, porém não eram coliformes termotolerantes, podendo ser coliformes totais.

Na legislação brasileira (BRASIL, 2001) não são contemplados limites máximos para coliformes fecais para pescado *in natura*, resfriado ou congelado, não consumido cru. Portanto, utilizou-se padrão estipulado por legislação internacional (ICMSF, 1986), que preconiza, em uma amostragem representativa de cinco amostras, a tolerância de três apresentando valores entre 11 e 500 NMP/g. Embora as análises procedidas neste experimento tenham sido indicativas, os valores encontrados estavam conforme o padrão encontrado no ICMSF (1986).

Os resultados do presente trabalho estão condizentes com legislação sul-africana (ÁFRICA DO SUL, 2000), que estipula valores encontrados no grupo de pescado cru inferiores a 10 NMP/100 g de amostra, com exceção da amostra 3, que onde foi encontrado resultados de  $1,33 \times 10^4$  UFC/g de amostra.

Na Nova Zelândia, considerando cinco amostras de um lote de pescado cru, somente duas amostras podem apresentar valores de ordem  $10^2$  a  $10^3$  UFC/g (NOVA ZELÂNDIA, 1995). Os valores encontrados no presente estudo estavam conformes com base na legislação, com exceção da amostra 3, que encontrou-se acima do padrão estipulado por apresentar resultados de  $1,33 \times 10^4$  UFC/g de amostra.

Nas legislações de Hong Kong (2001) e Japão (FAO, 2005), não há padrão estipulado de limites de crescimento para coliformes totais e fecais em pescado fresco.

Huss (1997) estipulou que a dose mínima infectante de *Escherichia coli* é da ordem de  $10^1$ , e especificamente para a estirpe 0157:H7 produtora de verotoxina, de  $10^3$ . Por ter sido feito contagem de coliformes termotolerantes, onde a *E. coli* é o único representante, não foi possível classificar as amostras do presente trabalho conforme os limites recomendados pelo autor referenciado.

A *E. coli* não é um bom indicador de contaminação fecal em ambientes marinhos por não resistir a salinidade da água do mar e exposição ao sol (VIERA et al., 2004), o que pode explicar os baixos índices encontrados no presente trabalho.

Os resultados encontrados na presente pesquisa corroboram com outros estudos em nível aquático, onde observou-se ausência ou baixas concentrações de coliformes termotolerantes. Dams et al. (1996) constataram ausência de coliformes de origem fecal em todas as amostras de pescadinha. Moura Filho et al. (2007) retrataram resultados variando desde  $< 0,03$  a  $2,4$  NMP/g em “sashimis” de atum. Vieira et al. (2000) observaram valores mínimos de  $3,0$  NMP/g de coliformes totais e termotolerantes em tilápias recém-capturadas.

Todavia, observam-se resultados elevados e fora dos padrão estipulado por ICMSF (1986) para coliformes termotolerantes em estudos de outros autores, sendo discrepantes dos encontrados no presente estudo. Dias (1998) verificou valores de coliformes termotolerantes superiores ao limite máximo permitido em 60% das amostras de “sushis” e “sashimis” comercializados, classificando-as como produtos em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. Martins (2011) obteve 1,67% dos

elementos amostrais de pescada com valores acima do estabelecido pelo ICMSF (1986). Lobo (2009) encontrou em 100% das amostras coletadas de pescado fresco números elevados de coliformes totais e termotolerantes, com valores acima de  $1,1 \times 10^3$  NMP/g de alimento.

#### 4.1.4 *Vibrio parahaemolyticus*

Foram encontrados resultados positivos para *Vibrio* spp. em todas as amostras, variando de  $2,40 \times 10^3$  a  $1,50 \times 10^6$  NMP/g de amostra (Tabela 3).

Tabela 3: Número Mais Provável de *Vibrio* spp./g de amostra.

<b>Amostra</b>	<b>NMP de <i>Vibrio</i> spp. (NMP/g)</b>
<b>1</b>	$2,40 \times 10^3$
<b>2</b>	$2,40 \times 10^3$
<b>3</b>	$2,40 \times 10^4$
<b>4</b>	$4,60 \times 10^4$
<b>5</b>	$9,30 \times 10^5$
<b>6</b>	$4,30 \times 10^5$
<b>7</b>	$4,60 \times 10^4$
<b>8</b>	$2,40 \times 10^4$
<b>9</b>	$2,40 \times 10^3$
<b>10</b>	$2,40 \times 10^4$
<b>11</b>	$2,40 \times 10^3$
<b>12</b>	$4,30 \times 10^3$
<b>13</b>	$1,50 \times 10^6$
<b>14</b>	$4,60 \times 10^4$
<b>15</b>	$4,60 \times 10^3$
<b>16</b>	$4,60 \times 10^3$
<b>17</b>	$1,10 \times 10^5$

A média da contagem de *Vibrio* spp. apresentada foi de 4,37 UFC/g de amostra, considerando 3,90 de intervalo de confiança (95%) e 0,92 de desvio padrão, conforme Fig. 35.

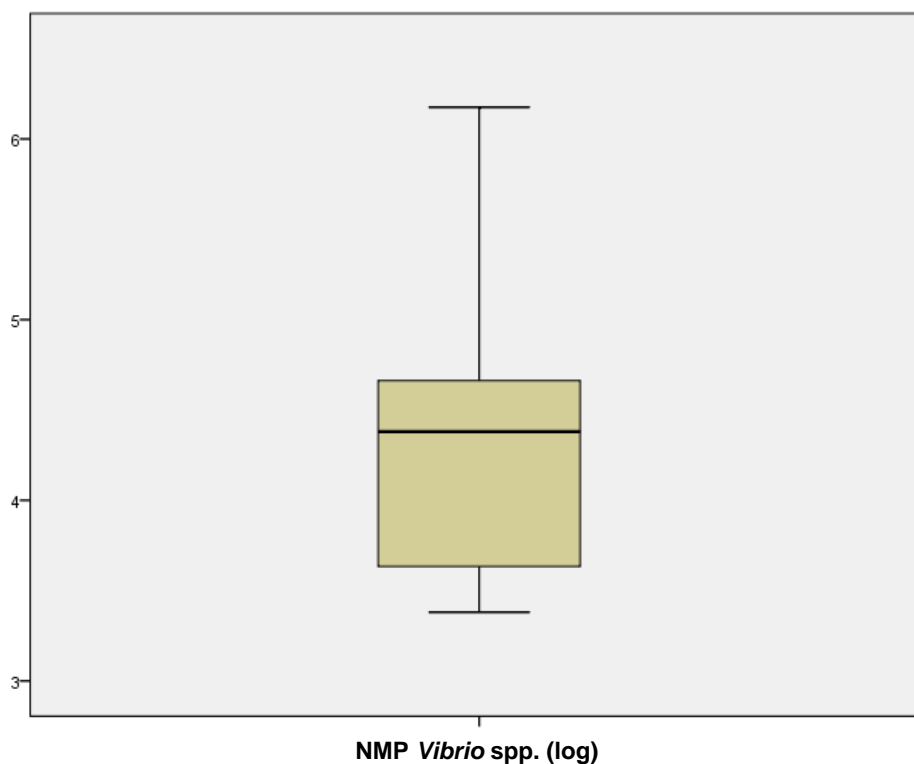


Fig. 35: Distribuição da contagem de *Vibrio* spp. em diagrama de caixa ("block spot").

Em duas amostras (os filés de cação de numeração 6 e 9) foram confirmados a presença de *Vibrio parahaemolyticus*. Obteve-se então um total de 11,8% de resultados positivos, contra 88,2% negativos para a bactéria. (Fig. 36). Estas amostras foram consideradas positivas por apresentar toda a sequência de resultados combinados nas provas adicionais para detecção da bactéria. Nas amostras positivas, a enumeração do microrganismo foi de  $4,30 \times 10^5$  e  $2,40 \times 10^3$ , respectivamente.

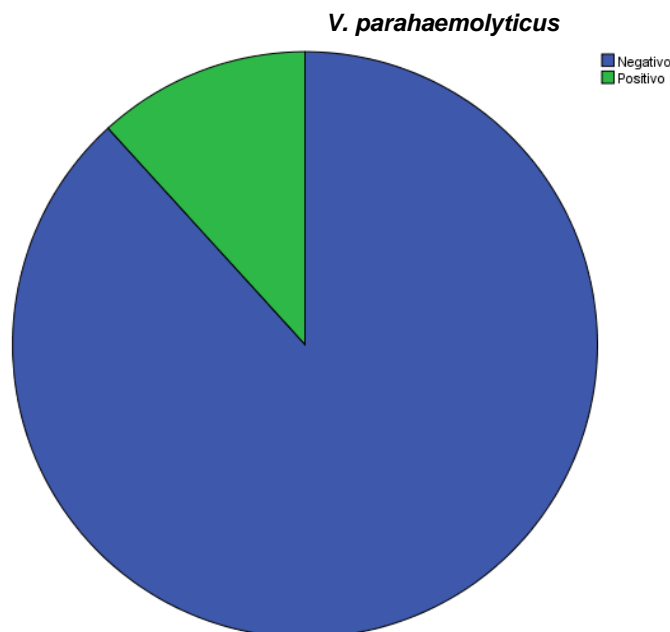


Fig. 36: Gráfico constando os resultados referentes a *V. parahaemolyticus*.

Na Resolução RDC nº 12 da ANVISA (BRASIL, 2001) não consta padrão limite de crescimento para o microrganismo. Porém, observam-se legislações e autores internacionais que estabelecem limites máximos da bactéria em pescado.

Huss (1997) estipulou o padrão limítrofe para *V. parahaemolyticus* de  $10^5$  UFC/g de pescado. No presente trabalho, foram encontrados a bactéria em duas amostras na ordem de  $10^3$ , valor inferior, e  $10^5$ , valor limítrofe ao preconizado. Então, pode-se afirmar que os resultados obtidos no presente experimento foram condizentes com o estipulado pelo autor e foram considerados como próprios para consumo.

Porém, os valores encontrados no atual estudo são considerados superiores aos padrões estipulados por legislações internacionais, como pode ser observado a seguir.

Conforme ICMSF (1986), recomenda-se a enumeração de *Vibrio parahaemolyticus* quando o peixe habita águas quentes e costeiras, principalmente destinado ao consumo cru. Os limites estabelecidos baseiam-se em análise de cinco amostras representativas, com a tolerância de duas apresentando valores entre  $10^2$  e  $10^3$ . Embora as análises procedidas neste experimento tenham sido indicativas, os valores encontrados nas amostras 6 e 9 estavam acima do padrão.



No Japão, é indicado o teste em filés de peixe de consumo cru, possuindo como padrão valores inferiores a 100 NMP/g de amostra (FAO, 2005), enquanto que em Hong Kong, considera-se como satisfatório quando o peixe cozido apresenta resultados inferiores a 20 NMP/g, e aceitável com valores entre 20 a 100 NMP/g. A partir de 100 NMP/g, considera-se o peixe como insatisfatório e inaceitável (HONG KONG, 2001).

A legislação sul-africana é mais rigorosa (ÁFRICA DO SUL, 2000). O padrão estimado para *V. parahaemolyticus* em peixes crus e parcialmente cozidos é ausência do microrganismo em 20 g de amostra.

A legislação neozelandesa não apresenta padrão para o microrganismo.

A presença de apenas duas amostras positivas no atual trabalho pode ser explicada baseando-se na aquisição das amostras nos meses de julho a agosto, onde a temperatura da água normalmente é mais fria. Segundo CVE (2008), o *V. parahaemolyticus* utiliza o lodo marinho como reservatório em meses frios, e em temperaturas mais quentes, é encontrado livremente na água do mar ou peixes e moluscos, por serem microrganismos mesófilos.

Na literatura, alguns estudos constam o isolamento do microrganismo em pescado. No presente estudo foram encontrados resultados similares a outras pesquisas, por serem encontradas duas amostras positivas para a bactéria. Hofer e Silva (1986) constataram que 54,8% de peixes marinhos de diferentes espécies eram portadores da bactéria. Chen (2004) obteve cerca de 4% de resultados positivos para *V. parahaemolyticus* em amostras de atum.

Em contrapartida, Dams et al. (1996) não constataram a presença de *V. parahaemolyticus* na amostragem de pescadinha. Moura Filho et al. (2007) não identificaram a bactéria nas amostras de “sashimis” de atum, e observaram apenas a presença de outras cepas de *Vibrio* spp. Os dados do presente trabalho não são condizentes com as pesquisas realizadas pelos autores em epígrafe, pois ocorreu a confirmação de duas amostras positivas para a bactéria.

#### 4.1.5 *Staphylococcus* coagulase positiva

As contagens encontradas nas análises de *Staphylococcus* spp. em todas as amostras analisadas foram consideradas relativamente baixas, variando entre  $7,00 \times 10^1$  e  $8,10 \times 10^3$  UFC/g de amostra, conforme tabela 4.

Tabela 4: Contagem de *Staphylococcus* spp. (UFC/g de amostra).

<b>Amostra</b>	<b>Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp.</b>
<b>1</b>	$4,30 \times 10^3$
<b>2</b>	$1,34 \times 10^3$
<b>3</b>	$4,70 \times 10^3$
<b>4</b>	$2,70 \times 10^3$
<b>5</b>	$5,90 \times 10^3$
<b>6</b>	$5,50 \times 10^3$
<b>7</b>	$2,20 \times 10^3$
<b>8</b>	$6,00 \times 10^2$
<b>9</b>	$7,00 \times 10^1$
<b>10</b>	$1,56 \times 10^3$
<b>11</b>	$1,61 \times 10^3$
<b>12</b>	$1,90 \times 10^2$
<b>13</b>	$4,30 \times 10^2$
<b>14</b>	$8,10 \times 10^3$
<b>15</b>	$1,44 \times 10^3$
<b>16</b>	$2,80 \times 10^2$
<b>17</b>	$4,40 \times 10^2$

A média dos resultados obtidos foi de 3,10, com intervalo de confiança para 95% de 2,80. O desvio padrão encontrado foi de 0,58 (Fig. 37)

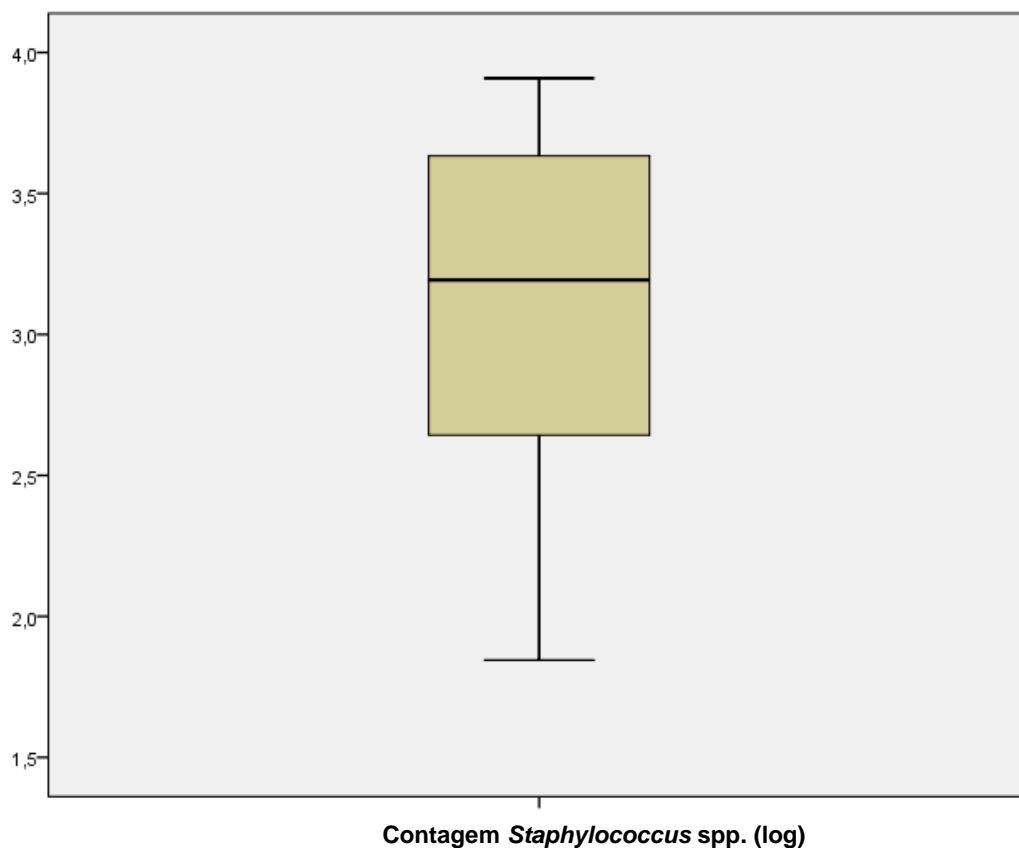


Fig. 37: Distribuição da contagem de *Staphylococcus* spp. em diagrama de caixa.

Em relação ao *Staphylococcus* coagulase positiva, a confirmação ocorreu em 15 amostras (88,2%), com exceção de duas (11,8%), as amostras codificadas como de número 2 e 14 (Fig. 38).

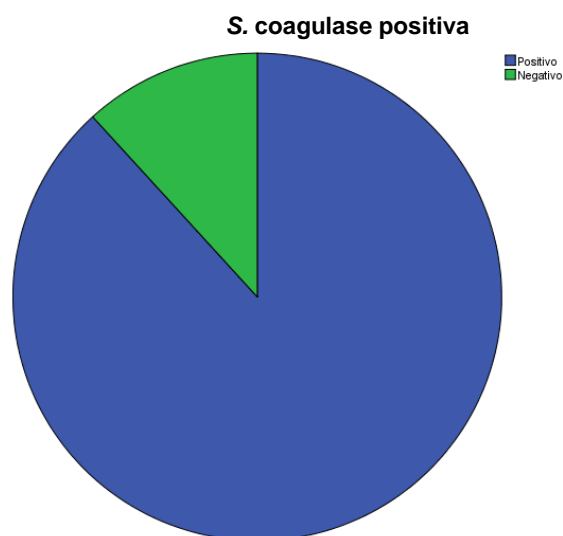


Fig. 38: Gráfico constando as amostras positivas para *S. coagulase* positiva.

O padrão preconizado pela legislação brasileira, Resolução RDC nº 12 da ANVISA (BRASIL, 2001), é de no máximo  $10^3$  em pescado *in natura*, resfriados ou congelados não consumidos crus. Sendo assim, todas as amostras estavam dentro do padrão, consideradas próprias para consumo.

O presente estudo, por apresentar a maioria das amostras positivas para a bactéria, contradiz muitas pesquisas encontradas em literatura onde o *Staphylococcus aureus* não foi detectado em pescado, ou encontrou-se a bactéria em poucas amostras.

Ayulo et al. (1994) identificaram a bactéria em apenas 20% das amostras de pescado. Damasceno (2009) não encontrou amostra positiva para *Staphylococcus coagulase* positiva em amostras de salmão. Dams et al. (1996) também relataram ausência do microrganismo avaliando pescadinha (*Cynoscion striatus*).

Em outros estudos, foram encontrados valores elevados de *S. aureus* em pescado fresco. Na atual pesquisa, os resultados corroboram os resultados encontrados em outras espécies de pescado. Haida e Muller (1984) obtiveram 45,3% de amostras de sardinhas acima da ordem de  $10^3$  UFC/g.

## 4.2 ANÁLISE SENSORIAL

O perfil traçado dos provadores consta que estes possuíam idades entre 19 e 57 anos, sendo em sua maioria do sexo feminino em ambos os dias de análise, com 82%. Apenas 18% dos participantes eram do sexo masculino.

Segundo os resultados encontrados no teste de preferência, no primeiro dia de análise sensorial, observou-se que o filé de cação preferido pelos provadores foi a amostra 7, apresentando maior média global (6,02), seguida pela amostra 3 (5,29), amostra 5 (5,02), amostra 2 (4,82) e, finalmente, amostra 1 (4,78). As amostras 5, 2 e 1 não apresentaram diferenças significativas entre si.

A amostra 7 obteve-se o melhor índice em relação aos atributos pesquisados, cor, aroma, sabor e textura, seguida pela amostra 3, e amostras 5, 2 e 1, que não apresentaram diferenças significativas.

Quanto ao atributo cor, a amostra 5 obteve-se melhor performance que a amostra 3, sendo os menores índices os das amostras 2 e 1, sem diferenças

significativas. No atributo aroma, as amostras 5 e 3 não possuíram diferenças significativas, assim como os filés 5, 2 e 1. Em relação à textura, as amostras 5 e 2 não possuíram diferenças significativas entre si, e o pior desempenho foi atribuído a amostra 1, conforme a tabela 5.

Tabela 5: Média dos atributos cor, aroma, sabor, textura das amostras, e média geral do primeiro dia de análise.

Atributos	Amostras				
	1	2	3	5	7
<b>Cor</b>	4,47d	4,49d	4,87c	5,24b	5,78a
<b>Aroma</b>	4,87c	4,89c	5,16b	5,00bc	5,76a
<b>Sabor</b>	4,71c	4,69c	5,16b	4,76c	6,02a
<b>Textura</b>	4,82d	5,18c	5,87b	5,18c	6,20a
<b>Geral</b>	4,78c	4,82c	5,29b	5,02c	6,02a

\*Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não são significativamente diferentes ( $p \leq 5\%$ ).

No segundo dia de análise sensorial, na amostra 15 foram obtidos os melhores resultados nos desempenhos global e atributos propostos. A amostra 9 apresentou-se com os índices mais baixos e foi a única amostra que obteve valores inferiores a 4, em ambos os dias de análise.

Quanto aos atributos propostos aos provadores, cor, aroma, sabor e textura, de modo generalizado, o melhor desempenho foi do filé de cação 15 e o pior, da amostra 9. Apenas no atributo aroma que na amostra 16 houve melhor resultado que a 15, porém sem diferenças significativas. Em relação à cor, as amostras 16 e 11 não foram significativamente diferentes. No atributo sabor, a amostra 11 foi mais preferida que a 16, ocorrendo o oposto em relação à textura (Tabela 6).

Tabela 6: Média de atributos cor, aroma, sabor, textura das amostras, e média geral do primeiro dia de análise.

Atributos	Amostras			
	9	11	15	16
<b>Cor</b>	3,80c*	4,47b	4,91a	4,64b
<b>Aroma</b>	3,64c	4,51b	4,76a	4,80a
<b>Sabor</b>	2,67d	5,04b	5,38a	4,78c
<b>Textura</b>	3,96b	5,22a	5,42a	5,27a
<b>Geral</b>	3,09b	5,07a	5,22a	5,04a

\*Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não são significativamente diferentes ( $p \leq 5\%$ ).

Considerando os resultados obtidos no teste da aceitação, a amostra 7 foi onde ocorreu o maior índice entre os provadores, com 96% de aceitação e apenas 4% de rejeição. O filé de cação 5 foi o menos aceito, com 80% de aceitação. Somente a amostra 9 não foi aceita, possuindo apenas 42% de notas iguais ou acima de quatro, e 58% de notas inferiores (tabela 7).

Tabela 7: Percentagem de aceitação e rejeição do file de cação

Respostas	Amostras								
	1	2	3	5	7	9	11	15	16
<b>Aceitação</b>	84	80	86	80	96	42	86	84	83
<b>Rejeição</b>	16	20	14	20	4	58	14	16	17

No final do questionário, o provador respondia a seguinte pergunta: “Você compraria esta amostra?”, podendo optar por sim, não ou talvez. Os resultados obtidos são apresentados em percentagem na tabela 8.

Tabela 8: Percentagem da intenção de compra do file de cação.

Respostas	Amostras								
	1	2	3	5	7	9	11	15	16
<b>Sim</b>	35	34	51	51	80	2	33	53	45
<b>Não</b>	29	33	25	29	9	80	31	20	20
<b>Talvez</b>	36	33	24	20	11	18	36	27	35

Na amostra 7 foi obtido melhor desempenho em relação a intenção de compra, com 80% de provadores afirmando que a comprariam, 8,9% que não a comprariam e 11,1% indecisos (Fig. 39).

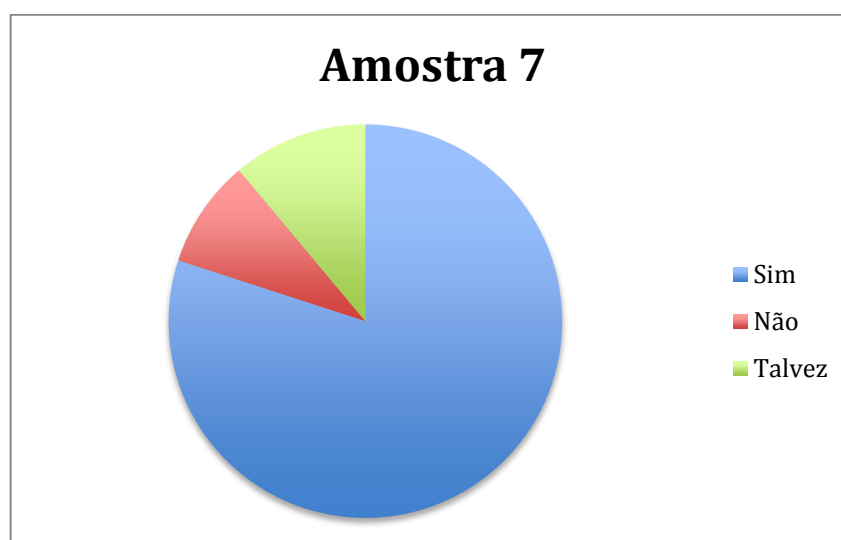


Fig. 39: Gráfico da intenção de compra da amostra 7.

O filé de cação de número 9 foi a amostra em que ocorreu a maior rejeição e, segundo os provadores, teria menor número de compradores, com apenas 2% de respostas positivas, 80% de negativas e 18% de provadores indecisos, conforme Fig. 40.

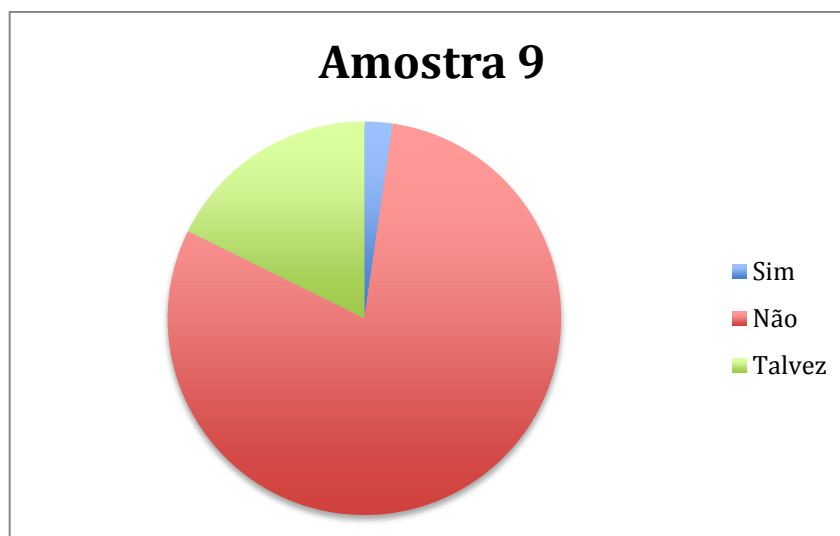


Fig. 40: Gráfico da intenção de compra da amostra 9 .

Portanto, a amostra 7 obteve-se melhor desempenho na análise sensorial. Os índices mais baixos encontrados foram referentes à amostra 9.

De modo geral, frente aos resultados obtidos na análise sensorial, observou-se que no filé de cação ocorreu uma boa avaliação dos consumidores. As respostas perante os diferentes atributos (cor, aroma, sabor, textura e média global) foram em sua maioria positivas.

Pode-se afirmar também que a carne do cação Anequim possui níveis elevados de aceitação, havendo grande intenção de compra pela opinião dos provadores. Os resultados encontrados na presente pesquisa são semelhantes aos de Barroso e Wiefels (2010), que relataram que o filé de cação se encontrava em 5º lugar dentre os pescados importados mais vendidos nos supermercados do Rio de Janeiro em 2009, com 4% das vendas.

Essa situação pode ser avaliada para inclusão de melhorias na execução de boas práticas nos pontos anteriores a venda atacadista. Além disso, servir de incentivo aos órgão oficiais para implantação de um padrão de identidade e qualidade do filé.

Na literatura brasileira e mundial, são escassos os trabalhos realizados sobre análise sensorial, tratando de peixe fresco. Em relação à filé de cação, nenhum estudo foi encontrado. O presente estudo se assemelha com muitos dos estudos encontrados em pescado fresco, corroborando que a matriz alimentícia é aceita e aprovada pelos consumidores.



Bernardi (2012) encontrou melhor aceitação para a amostra de peixe-sapo no dia zero, sem, contudo, haver rejeição dos consumidores pelas amostras no dia quatro.

O estudo de Martins (2011) apresentou, em análise de frescor, a avaliação dos consumidores entre boa e moderada da pescada fresca, tendo a maior parte de respostas perante os diferentes atributos como positivas.

Silva (2010) encontrou no início do período de estocagem sob refrigeração os escores médios de 1,83 para a sardinha verdadeira e 2,00 para a sardinha boca-torta.

Fontes et al. (2007) verificaram que o estado de frescor do pescado comercializado em varejo variou entre “bom” e “satisfatório” (entre estados de frescor “ótimo, “bom” e satisfatórios”), obtendo como resultados todas as amostras aptas para consumo.

Andrade (2006) concluiu que as amostras de atum frescas e as amostras estocadas em gelo por nove dias obtiveram boa aceitação pelos julgadores, apesar das frescas terem obtido melhor aceitação no atributo sabor.

Borges (2005) obteve nos dias zero, sete e 15 de estocagem sob gelo os escores de aceitação entre seis e oito, e concluiu que as corvinas obtiveram uma boa aceitação pelos julgadores.

Batista et al. (2004) verificaram que o matrinxã alterou-se levemente até o 20º dias de estocagem, em análise de odor, sabor e textura da musculatura do animal. Foram classificadas neste período de tempo como classe A (especial).

#### 4.3 RELAÇÃO ENTRE RESULTADOS BACTERIOLÓGICOS E SENSORIAIS

A tabela 9 consta a relação entre os resultados obtidos nas análises bacteriológicas e teste de aceitação sensorial.

Tabela 9: Relação dos resultados bacteriológicos e sensorial.

Amostra	Resultados	
	Bacteriológicos	Sensorial
1	Condições higiênico-sanitárias adequadas	Boa aceitação
2	Condições higiênico-sanitárias adequadas	Boa aceitação
3	Condições higiênico-sanitárias adequadas	Boa aceitação
4	Presença de <i>Salmonella</i> spp.	-
5	Condições higiênico-sanitárias adequadas	Boa aceitação
6	Presença de <i>Salmonella</i> spp. e <i>V. parahaemolyticus</i>	-
7	Condições higiênico-sanitárias adequadas	Boa aceitação
8	Presença de <i>Salmonella</i> spp.	-
9	Presença de <i>V. parahaemolyticus</i>	Não aceita
10	Presença de <i>Salmonella</i> spp.	-
11	Condições higiênico-sanitárias adequadas	Boa aceitação
12	Presença de <i>Salmonella</i> spp.	-
13	Presença de <i>Salmonella</i> spp.	-
14	Condições higiênico-sanitárias adequadas	-
15	Condições higiênico-sanitárias adequadas	Boa aceitação
16	Condições higiênico-sanitárias adequadas	Boa aceitação
17	Presença de <i>Salmonella</i> spp.	-

Segundo os resultados bacteriológicos, todas as amostras estavam dentro dos padrões estipulados para CBHAM e CBHAP (ICMSF, 1986), coliformes termotolerantes (ICMSF, 1986) e *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2001).

As amostras 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 15 e 16 não se encontraram contaminadas pela bactéria *Salmonella* spp. As amostras 4, 6, 8, 10, 12, 13 e 17, por apresentar presença da bactéria *Salmonella* spp., foram consideradas impróprias para consumo (BRASIL, 2001) e foram descartadas, não utilizadas na análise sensorial.

Todas as amostras, com exceção das de numeração 6 e 9, possuíam ausência da bactéria *Vibrio parahaemolyticus*. Conforme ICMSF (1986), as enumerações encontradas nas amostras 6 e 9 estavam acima do padrão estipulado, sendo consideradas impróprias para consumo.

Em relação aos resultados obtidos na análise sensorial, a amostra 7 foi julgada como melhor desempenho e os índices mais baixos encontrados foram referentes à amostra 9, que não obteve valores suficientes e foi rejeitada.

A amostra 14, que se apresentou como própria para consumo de acordo com os resultados bacteriológicos, não foi utilizada na análise sensorial por apresentar descaracterização de coloração e odor da carne de cação.

Pode-se observar que a amostra 9 foi a única a não possuir condições higiênico-sanitárias adequadas, pela presença de *V. parahaemolyticus*, e utilizada na avaliação sensorial, onde houve rejeição por parte dos julgadores. Não há dados científicos que relatem que a presença da bactéria encontrada em matriz alimentícia promova alterações sensoriais no produto.

## 5 CONCLUSÃO

Considerando os resultados apresentados, pode ser concluído que o consumo dos filés de cação Anequim (*I. oxyrinchus*), comercializados em mercados de Niterói, podem gerar riscos à saúde humana pela presença de *Salmonella* spp., em 41,2% das amostras, e *V. parahaemolyticus*, em 11,8% de filés amostrais.

Conclui-se ainda que a carne de cação é aceita pelos consumidores, totalizando 94,2% de aceitação, e, segundo a intenção de compra, é comercializada com frequência em Niterói, Rio de Janeiro.

Promovendo uma relação entre os dados encontrados nas duas análises, é necessário a implantação de padrões de identidade e qualidade do filé junto aos órgãos oficiais, para que haja a comercialização do produto em conformidade com padrões estipulados em legislação, não promovendo riscos à saúde coletiva.

Também, é de suma importância a aplicação de Boas Práticas de Manipulação alinhadas à outras ferramentas de controle de qualidade, por parte dos pescadores e manipuladores da carne de cação, evitando a contaminação da matriz alimentícia estudada.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁFRICA DO SUL. Department Of Health. *Guidelines for environmental health officers on the interpretation of microbiological analysis data of food*. África do Sul: South African Department of health, Directorate of food control, 2000, 28 p.

AKEDA, Y. NAGAYAMA, K., YAMAMOTO, K., HONDA, T. Invasive phenotype of *Vibrio parahaemolyticus*. *The Journal of Infectious Disease*, Estados Unidos: Oxford University Press, v. 176, p. 822-824, 1997.

ALBUQUERQUE, W.F.; EVANGELISTA-BARRETO, N.S.; SILVA, A.I.M; VIEIRA, R.H.S.F. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* e *Estafilococos* coagulase positiva em sushis comercializados em alguns estabelecimentos de Fortaleza-CE. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 20, n.146, p. 58-61, nov., 2006.

ÁLVARES, P. P.; MARTINS, L.; BORGHOFF, T.; SILVA, W. A.; ABREU, T. Q.; GONÇALVES, F. B. Análise das características higiênico-sanitárias e microbiológicas de pescado comercializado na grande São Paulo. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 22, n. 161, p. 88-93, 2008.

ANDRADE, P.F. *Avaliação do prazo de vida comercial do atum (Thunnus atlanticus) armazenado sob refrigeração*. Niterói, 2006. 97 f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2006.

AYULO, A.M.; MACHADO, R.A.; SCUSSEL, V.M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam: Elsevier Science, v.24, n.1-2, p. 171-178, 1994.

BARRETO, N.S.E.; MOURA, F.C.M.; TEIXEIRA, J.A.; ASSIM, D.A.; MIRANDA, P.C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias do pescado comercializado no município de Cruz das Almas, Bahia. *Revista Caatinga*, Mossoró: UERSA, v. 25, n. 3, p.86-95, jul-set, 2012.

BARROS, C.G. Perda da qualidade do pescado, deteriora e putrefação. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária*, Brasília, v.2, n.30, set/dez, 2003.

BARROSO, R.M.; WIEFELS, A.C. *O mercado de pescado na região metropolitana do Rio de Janeiro*. Uruguai: INFOPECA, 2010. 103 p. Série: O mercado do pescado nas grandes cidades latino-americanas.

BATISTA, G.M.; LESSI, E.; HODAIRA, M.; FALCÃO, P.T. Alterações bioquímicas *post-mortem* de matrinxã *Brycon cephalus* (GUNTHER, 1869) procedente da

piscicultura, mantido em gelo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 24, n.4, p. 573-581, 2004.

BEIRÃO, L.H.; TEIXEIRA, E.; NORT, E.; BOING, S.M.C. Salga de cação (*Squatina argentina*) e abrotéa (*Urophycis brasilienses*). *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, Curitiba, v.14, n. 1, jan./jun., 1996.

BERNARDI, D.C. *Método do índice de qualidade (MIQ) desenvolvido para a espécie marinha peixe-sapo (Lophius gastrophysus) eviscerada e estocada em gelo*. Niterói, 2012. 103 f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2012.

BONFIL, R. *Overview of world elasmobranch fisheries*. Roma: FAO, 1994. (FAO Fisheries Technical Paper 341).

BORGES, A. *Qualidade da corvina (Micropogonias furnieri) eviscerada e inteira em diferentes períodos de estocagem à temperatura de 0°C*. Niterói, 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, alterado pelos decretos nº 1.255 de 25 de junho de 1962, nº 1.236 de 02 de setembro de 1994, nº 1.812 de 08 de fevereiro de 1996 e nº 2.244 de 04 de junho de 1997. Aprova o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitário de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 241, 05 jun. 1997. Seção 1.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos e seus Anexos I e II. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, nº 7-E, p. 45-53, 10 jan. 2001. Seção 1.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, p.14, 18 set. 2003. Seção 1.

CASTRO, J.I.; WOODLEY, C.M.; BRUDECK, R.L. *A preliminary evaluation of the status of shark species*. Parte 1. Roma: FAO, 1999. v. 4, p. 237-249. (FAO Fisheries Synopsis).

CALIXTO, F.A.A. Avaliação dos parâmetros bacteriológicos em mexilhão, *Perna perna*, de mitilicultura da Baía de Ilha Grande, RJ, submetidos a irradiação gama. Niterói, 2010. 99 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2010.

CHEN, J. *Pesquisa de Vibrio parahaemolyticus em atum (Thunnus spp.) comercializado na zona sul do município de São Paulo – SP.* São Paulo, 2004. 68 f. Dissertação (Medicina Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2004.

COMPAGNO, L.J.V. Species catalogue. *Sharks of the world: an annotated and illustrated catalogue of sharks species know to date.* Volume 2. Bullread, mackerel and carpet sharks (Heterodontiformes, Lamniformes and Orectolobiformes). Rome: FAO, 2002. v. 2. (FAO Fisheries Purposes).

COSTA, I.P. *Técnicas e práticas em laboratório de microbiologia de alimentos e água.* Maranhão, 2011. 32 f. Relatório (Estágio em Química Industrial) – Departamento em Tecnologia Química, Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, 2011.

CVE. Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica. INFORME-NET DTA. Manual das doenças transmitidas por alimentos. Disponível em: <[ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\\_tec/hidrica](ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica)>. Acesso em: dez 2012.

DAMASCENO, A. *Qualidade (sensorial, microbiológica, físico-química e parasitológica) de salmão (Salmo salar, Linnaeus, 1778) resfriado, comercializado em Belo Horizonte, MG.* Belo Horizonte, 2009. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

DAMS, R.I; BEIRÃO, L.H.; TEIXEIRA, E. Avaliação da qualidade microbiológica da pescadinha (*Cynoscion striatus*) inteira e em filés nos principais pontos críticos de controle de uma indústria de pescado congelado. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, Paraná: CEPPA, v. 14, n. 2, jul/dez, 1996.

DIAS, F.J.E. *Avaliação microbiológica de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) de sushi e sashimi consumidos nos restaurantes do município do Rio de Janeiro.* Niterói, 1998. 97 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 1998.

DUTCOSKY, S. D. *Análise sensorial de alimentos.* 3 ed. Curitiba: Champagnat, 2011. 426p.

ENCICLOPEDIA Vida Selvagem. *Os Tubarões*. 2006. Disponível em <[http://www.encyclopedia.com.pt/articles.php?article\\_id=190](http://www.encyclopedia.com.pt/articles.php?article_id=190)>. Acesso em: 13 jul. 2011.

FAO. Fisheries and Aquaculture Department. *Causes of detentions and rejections in international fish trade*. Roma: FAO, 2005.

\_\_\_\_\_. Fisheries and Aquaculture Department. *Safety of fish and fish products*. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/topic/1522/en>>. Acesso em 13 out. 2011.

\_\_\_\_\_. Fisheries and Aquaculture Department. *Species Facts Sheets – Isurus oxyrinchus (Rafinesque, 1809)*. Serviço de referência. Apresenta características da espécie. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/species/2011/en>> . Acesso em 26 abr. 2012.

FEHD. Food and Environmental Hygiene Department. *Vibrio species in seafood*. Government of the Hong Kong Special Administrative Region. Risk Assessment Studies n° 20. Disponível em: <[http://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme\\_rafs/programme\\_rafs\\_fm\\_01\\_02\\_vss.html](http://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme_rafs/programme_rafs_fm_01_02_vss.html)>. Acesso em 23 dez. 2012.

FONTES, M. C.; ESTEVES, A.; CALDEIRA, F.; SARAIVA, C.; VIEIRA-PINTO, M.; MARTINS, C. Estado de frescor e qualidade higiênica do pescado vendido numa cidade do interior de Portugal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais, v. 9, n. 5, p. 1308-1315, 2007.

FOOD DESIGN. Desenvolvimento de produtos alimentícios – integração técnica & marketing. *Sistema da qualidade em alimentos*. São Paulo, 1998. 51p.

FORCELINI, H.C.D. *Depuração de ostras de cultivo da Baía de Guaratuba, PR, Brasil*. Pontal do Paraná, 2009. 81 f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Costeiros e Oceânicos) – Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná, Pontal do Paraná, 2009.

FRANCO, G. *Tabela de Composição Química dos Alimentos*. 9 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2001. 324 p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia de alimentos*, São Paulo: Atheneu, 2005. 182 p.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. *Higiene e vigilância sanitária dos alimentos*. 4. ed. Barueri, São Paulo: Manole, 2011. 1088 p.



HAIDA, K.S.; MULLER, E.E. Estudo bacteriológico da sardinha (*Sardinella aurita*) comercializada em Londrina, Paraná. *Semina Ciências Agrárias*, Londrina: Universidade Estadual de Londrina, v. 5, n 17, p. 53-56, 1984.

HOFER, E.; SILVA, C.H.D. Caracterização sorológicas de amostras de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de peixes capturados no litoral brasileiro. *Revista de Microbiologia*, São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, v. 17, n. 4, p. 327-332, 1986.

HONDA, T.; NI, Y.; MIWATANI, T. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infection and Immunity*, Washington: ASM, v. 56, p.961-965, 1988.

HONG KONG. Food and Environmental Hygiene Department. *Microbiological guidelines for ready-to-eat food*. Hong Kong: Food and Environmental Hygiene Department, 2001. 10 p.

HUSS, H.H. *Garantia da qualidade dos produtos da pesca*. Roma: FAO, n. 334, 1997. 176 p. FAO Documento Técnico sobre as Pescas.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. *Estatística da Pesca 2007 – Brasil: grandes regiões e unidades da Federação*. Brasília, 2007. 151p.

ICCAT. International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas. *Report of the 2008 shark stock assessments meeting*. ICCAT/SCRS/017. 2008. Disponível em < [http://www.iccat.int/Documents/Meetings/Docs/2008\\_SHK\\_Report.pdf](http://www.iccat.int/Documents/Meetings/Docs/2008_SHK_Report.pdf)>. Acesso em 29 jun. 2011.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Specific Applications*. In:\_\_\_\_\_. *Microorganisms in Food*. 2 ed. Nova Iorque: University of Toronto Press, 1986.

JAKSIC, S.; UHITIL, S.; PETRAK, T.; BAZULIC, D.; KAROLYI, L.G. Occurrence of *Vibrio* spp. in sea fish, shrimps and bivalve molluscs harvested from Adriatic sea. *Food Control*, Europa: Elsevier, v. 13, p. 491-493, 2002.

JAY, J. M. Frutos do Mar. In:\_\_\_\_\_. *Microbiologia de Alimentos*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p. p.119-130.

LACK, M.; SANT, G. *World shark catch, production and trade 1990 – 2003*. Australian Government/Traffic Oceania, 2006. Disponível em <

<http://www.environment.gov.au/coasts/publications/pubs/trends-shark-catch.pdf>>. Acesso em 29 jun. 2011.

LEITÃO, M.F.F. Microrganismos patogênicos em alimentos. In: ROITMAN, I.; TRAVASSO, L.R.; AZEVEDO, J.L. *Tratado de Microbiologia*. São Paulo: Manole, 1988. 186 p. v. 1, p. 30-31.

LIBRELATO, F.R.; SHIKIDA, S.A.R.L. Segurança alimentar: um estudo multidisciplinar da qualidade do filé de tilápia comercializado no município de Toledo-PR. *Informe GEPEC*, Paraná: Unioeste, v. 9, n. 2. 2005.

LIRA, G.M.; PEREIRA, W.D.; ATHAYDE, A.H.; PINTO, K.P. Avaliação da qualidade de peixes comercializados na cidade de Maceió - AL. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo. v. 15, n. 84, p. 67 - 72, maio, 2001.

LIUSON, E. *Pesquisa de coliformes totais, fecais e Salmonella spp. em tilápias de pesqueiros da região metropolitana de São Paulo*. São Paulo, 2003. 94 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2003.

LOBO, P.T.D. *Avaliação microbiológica do pescado fresco comercializado no Centro de Abastecimento do Município de Feira de Santana, Bahia, 2008-2009*. Feira de Santana, 2009. 79 f. Monografia (Especialidade em Biologia Celular) – Curso de Especialização em Biologia Celular, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 2009.

MACEDO, L.F.L. *Remoção de mercúrio e arsênio em cação-azul, Prionace glauca*. São Paulo, 2010. 92 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Área de Bromatologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.

MACFIE, H.J.H.; BRATCHEL, N.; GREENHOFF, K.; VALLIS, L. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. *Journal of Sensory Studies*, Estados Unidos: Wiley, v. 4, n. 2, p. 129-148, 1989.

MAGALHÃES, M.; MAGALHÃES, V.; ANTAS, M.G.; TATENO S. Caracterização bacteriológica e sorológica de linhagens de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de humanos e de ostras no Recife, Brasil. *Revista de Microbiologia*, São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, v.22, n.2, p. 83-88, 1991.

MATTÉ, M.H.; BALDASSI, L.; BARBOSA, M.L.; MALUCELLI, M.I.C., NITRINI, S.M.O.O.; MATTÉ, G.R. Virulence factors of *Vibrio metschnikovii* strains isolated from fish in Brazil. *Food Control*, Europa: Elsevier, n. 18, p. 747-754, 2007.

MARTINS, C.N. *Parâmetros de qualidade e valoração de pescada da espécie *Macrodon ancylodon* (Bloch & Schneider, 1801): características sensoriais, físico-*

químicas, microbiológicas, parasitológicas e contaminantes inorgânicos. São Paulo, 2011. 196 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2011.

MONTEALEGRE-QUIJANO, S.; CHAVES, V., VOOREN, C.M.; SOTO, J.M.R. Sobre a ocorrência, distribuição e abundância de tubarões Lamniformes no ambiente oceânico do sul do Brasil e águas internacionais adjacentes. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ictiologia*, v. 86, p. 6-8, 2007.

MONTEIRO, C.L.B. *Técnicas de avaliação sensorial*. 2 ed. Curitiba: Universidade Federal do Paraná - Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, 1984. 101 p., p. 55-58.

MORALES-AIZPURÚA, I.C.; TENUTA-FILHO, A.; SAKUMA, A.M.; ZENEBON, O. Mercúrio total em cação comercializado em São Paulo – SP, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 19, n. 3, set./dez., 1999.

MOURA FILHO, L.G.M.; MENDES, E.S.; SILVA, R.P.P.; GÓES, L.M.N.B.; VIEIRA, K.P.B.A.; MENDES, P.P. Enumeração e pesquisa de *Vibrio* spp. e coliformes totais e termotolerantes em “sashimis” de atum e vegetais comercializados na região metropolitana do Recife, Estado de Pernambuco. *Acta Scientiarum Technology*, Maringá: Eduem, v. 29, n.1, p. 85-90, 2007.

NEW BRUNSWICK. *Shorfin Mako Shark*. Disponível em <<http://new-brunswick.net/new-brunswick/sharks/species/sfmako.html>>. Acesso em 28 jun. 2011.

NOAA. *FishWatch – U.S. Seafood facts: Atlantic Shortfin Mako Shark (*Isurus oxyrinchus*)*. Disponível em <[http://www.nmfs.noaa.gov/fishwatch/species/atl\\_shortfin\\_mako.htm](http://www.nmfs.noaa.gov/fishwatch/species/atl_shortfin_mako.htm)>. Acesso em 29 jun. 2011.

NOVA ZELÂNDIA. Food Administration Manual. *Microbiological reference criteria for food*. 2 ed. Nova Zelândia: Ministry of Health, 1995. 25 p.

OGAWA, M. Sobre a industrialização de cações no nordeste brasileiro: aproveitamento da carne e barbatanas. *Arquivos de Ciência do Mar*, Fortaleza: Labomar, v. 13, p. 91-97, 1973.

OGAWA, M.; MAIA, E.L. *Manual da Pesca: Ciência e tecnologia do pescado*. São Paulo: Varela, 1999. 464 p., v. 1, p. 253 – 269.

ORDÓÑEZ, A.O. *Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal*. Porto Alegre: Artmed, 2005. 279 p., v. 2, cap.12, p. 299-228.

PELCZAR, M.J.; REID, R.; CHAN, E.C.S. *Microbiologia*. São Paulo: McGraw Hill Brasil, 1981. V. 2, 480p.

PEREIRA, C.S.; POSSAS, C.A.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, D.P. Características de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de mexilhões (*Perna perna*) comercializados em Niterói, Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Brasília: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 40, n. 1, p. 56-59, jan-fev, 2007.

PEREIRA, M.A.; NUNES, M.M.; NUERNBERG, L.; SCHULZ, D.; BATISTA, C.R.V. Microbiology quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis – Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, v. 37, p. 159-163, 2006.

RIPPEY, S.R. Infectious disease associated with molluscan shellfish consumption. *Clinical Microbiology Reviews*, Estados Unidos: American Society of Microbiology, n. 7, p. 419-425, 1994.

RODRIGUES, D.P. Perspectivas atuais e falhas no diagnóstico antigênico de *Salmonella* spp.: importância no reconhecimento dos sorovares circulantes, emergentes e exóticos. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE SALMONELOSE AVIÁRIA, 1., 2011, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro: Associação Latino-Americana de Avicultura, 2011. 7 p.

RODRIGUES, K. B. *Histamina x Pescado* – Revisão Bibliográfica. Espírito Santo, 2007. 24 f., TCC (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Centro Universitário Vila Velha, 2007. Disponível em: <[http://www.gipescado.com.br/banco%20teses\\_dissert/tcc/tcc\\_Karla%20R.pdf](http://www.gipescado.com.br/banco%20teses_dissert/tcc/tcc_Karla%20R.pdf)>. Acesso em: 28 jun. 2011.

SÁ, E. Conservação do Pescado. *Revista Aqüicultura e Pesca*, São Paulo: SEBRAE, n.1, jun., p. 20-26, 2004.

SANTOS, C.A.M.L. Doenças transmitidas por pescado no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 37., 2010, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2010.

SBEEEL. Sociedade Brasileira para o Estudo de Elasmobrânquios. *Plano nacional de ação para conservação e o manejo de peixes elasmobrânquios no Brasil*. Recife, 2005. 100 p.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Ministério da Saúde. Dados Epidemiológicos – DTA período de 2000 a 2011\*, 2011. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados\\_epidemiologicos\\_dta\\_15911.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_epidemiologicos_dta_15911.pdf)>. Acesso em 14 fev. 2013.

SILVA, M.C.; NORMANDE, L.C.A.; FERREIRA, V.M.; RAMALHO, S.L. Avaliação da qualidade microbiológica do pescado comercializado em Maceió, AL. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 6, n. 96, p. 60 – 64, nov., 2002.

SILVA, M.L. *Pesquisa de Aeromonas spp., Vibrio spp. e da qualidade sanitária de peixes comercializados na cidade de São Paulo*. São Paulo, 2007. 146 p.  
Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Departamento de Prática em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2007.

SILVA, S.C. *Validade comercial de sardinhas inteiras e refrigeradas avaliada por análises físico-químicas, bacteriológicas e sensorial*. Niterói, 2010. 107 f.  
Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2010.

SIQUEIRA, R.S. *Manual de Microbiologia de Alimentos*. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 1995. 159 p.

SOARES, V.M. PEREIRA, J.G.; IZIDORO, T.B.; MARTINS, O.A.; PINTO, J.P.A.N.; BIONDI, G.F. Qualidade microbiológica de files de peixe congelados distribuídos na cidade de Botucatu – SP. *UNOPAR Científica – Ciências biológicas e da saúde*, Londrina: Universidade Norte do Paraná, v. 12, n. 2, p. 85-88, 2011.

SØRHOUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends in Food Science and Technology*, Cambridge: European Federation of Food Science and Technology, v.8, p.35-41, 1997.

TORTORA, G.J.; FUNKE, R.B.; CASE, C.L. *Microbiologia*. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed. 2003. 827 p.

VANNUCCINI, S. *Shark utilization, marketing and trade*. Rome: FAO, 1999. 470 p. (FAO Fisheries Technical Paper, 389).

VIEIRA, K.V.M; MAIA, D.C.C.; JANEIRO, D.I.; VIEIRA, R.H.S.F.; CEBALLOS, B.S.O. Influência das condições higiênico-sanitárias no processo de beneficiamento de tilapias (*Oreochromis niloticus*) em filés congelados. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 14, n. 74, p.37 – 40, 2000.

VIEIRA, R.H.S.F.; RODRIGES, D.P.; BARRETO, N.S.E.; SOUSA, V.; TORRES, R.C.O.; SAMPAIO, S.S.; NASCIMENTO, S.M.M. *Microbiologia, higiene e qualidade do pescado*. São Paulo: Varela, 2004. 380 p., v. 1, p. 89 – 130.

WHO. World Health Organization. *Foodborne disease outbreaks*. Geneva, Switzerland: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2008. 152 p.

YOUSSEF, H.; EL-TIMAWI, A. K. AHMED. Role of pathogens of freshwater fish in transmission of humans diseases. *Journal of Food Protection*, Iowa: International Association of Food Protection, v. 55, n. 9, p. 739-740, 1992.