

**EDUARDO
MONTELLANE**

ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS MARINHAS E COSTEIRAS

Monografia para obtenção do grau de licenciatura em Biologia Marinha

Avaliação da Qualidade Microbiológica do Gelo usado na Conservação do Pescado nos mercados da cidade Quelimane- Província da Zambézia.



Autor:

Óscar Joaquim Mazivila

**EDUARDO
MONTELLANE**

ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS MARINHAS E COSTEIRAS

Monografia para obtenção do grau de licenciatura em Biologia Marinha

**Avaliação da Qualidade Microbiológica do Gelo usado na
Conservação do Pescado nos Mercados da cidade Quelimane-
Província da Zambézia.**

Autor:

Óscar Joaquim Mazivila

Supervisor:

dr. Mauro Gabriel Uqueio

Quelimane, Novembro de 2017

Dedicatória

É com muita honra e prestígio que dedico esse trabalho aos meus pais, Joaquim Salvador Mazivila e Julieta Wilson Funzamo pelos valores éticos e morais embutidos na minha caixa crónica.

Agradecimentos

Agradeço sempre a esta energia maior que rege o mundo a quem chamo de Deus, pela vida, pelo valor que dou a ela e por ser a minha fortaleza.

Agradecer aos meus pais, principalmente a minha querida mãe Julieta Wilson Funzamo pelo amor, assistência, confiança na minha carreira e pelo investimento a longo prazo. Margarida Mazivila, minha irmã por acreditar em mim e pelos conselhos. Aos técnicos de laboratório de inspeção de pescado em Quelimane, expresso meus agradecimentos por ter aberto as portas para desenvolver este tema desde o início até ao fim, pela oportunidade de conhecimento e crescimento profissional e sobretudo, pela paciência. (Msc. Gundana e dr. Edson). Agradecimento especial vai ao meu orientador pela dedicação durante a concretização deste trabalho, pela sua amizade, paciência, orientação, confiança, A você dr. Mauro Gabriel Uqueio, minha eterna reverência e admiração.

A ESCMC, por ajudar na minha formação profissional e pessoal. Especialmente aos docentes, Msc. Vicente Mabota, Msc. Yolanda, Msc. Isabel Mucavele, dr. Eurico Morais, professor Daniel Mualeque e Dr^a. Eulalia Mugabe, agradeço por terem me ensinado a ler, escrever, analisar, compreender, ser e estar.

Samuel Chichava agradeço por ser um amigo de verdade, pela cumplicidade, pelo apoio financeiro nos momentos que mais precisei e por ser aquele que sempre puchou me orelhas. Nadia Munhanga, minha filha, agradeço por acreditar no meu potencial e pela amizade.

Aos meus colegas de 2014 principalmente de Biologia Marinha com maior destaque para Deolinda Chaúque, Jorge Macucule, Francelina Soquiço e Orlando Macicame pelo amor verdadeiro, aproximação, admiração e acima de tudo pelo respeito. Aos meus companheiros do condomínio, Mazuze, Mirolas e o Hercildo meus agradecimentos pelo apoio psicológico, moral e cívico etc.

A equipe de futsal da ESCMC, Guelton, Fenias, Guta, Orlando Jamisse, Matola, Timba, Sodasse, Tembe, Davide, Justino, Sergio, Sebastião, Hermenegildo, Debierno, sobretudo Dinis Nhassengo por ter sido um professor da arte do futebol, *thanks* Dinas.

Atrás de um grande homem existe uma grande mulher, agradeço a minha esposa, Mel da Conceição Ubisse pelo amor, companhia, intimidade, cumplicidade e pelo menino mas lindo Jaden Óscar Mazivila.

Declaração sob compromisso de honra

Eu, Óscar Joaquim Mazivila, por minha honra, declaro que o intitulado Avaliação microbiológica do gelo usado na conservação do pescado nos mercados da cidade Quelimane-Província da Zambézia, foi pesquisado por mim sob orientação de dr. Mauro Gabriel Uqueio.

Este trabalho, fi-lo na base dos ombros gigantes arrolados ao longo do mesmo, com ouvidos apurados sob a orientação do supervisor e respeitando as normas plasmadas no regulamento da Escola Superior de Ciências Marinhas e Costeiras.

Declaro ainda que este trabalho não foi apresentado em nenhum momento para a obtenção de qualquer grau académico ou outros fins.

Autor:

(Óscar Joaquim Mazivila)

Resumo

O gelo é um dos métodos usado na conservação do pescado, uma vez que tem a capacidade de manter as suas propriedades iniciais e prolongar o seu tempo de prateleira. Entretanto, se for processado sob más condições higiénico-sanitárias pode afectar a qualidade do pescado. Este que por sua vez pode tornar-se um factor de risco para os consumidores. A pesquisa centrou-se em avaliar a qualidade microbiológica do gelo usado na conservação do pescado na cidade Quelimane-província da Zambézia. Foram colectadas 12 amostras em 3 mercados referenciados por (A, B e D) e as amostras foram analisadas no laboratório de Instituto Nacional de Inspeção do pescado de Quelimane. Identificaram-se e quantificaram-se, os coliformes (totais, termotolerantes, *Escherichia coli*), *Enterococcus* spp e Estafilacocos coagulase positiva, quantificaram-se bactérias mesófilos e psicrotróficos e também detectaram-se a presença de *Salmonella* spp. Para a identificação e quantificação dos coliformes e *Enterococcus* spp usou-se a técnica de membrana filtrante. O método de contagem em placas foi usado para bactérias mesófilos e psicrotróficos e a técnica de sementeira em superfície, usou-se para a identificação e quantificação de Estafilacocos coagulase positiva e para detecção de *Salmonella* spp. Foram confirmados, 10 (41.7%) de coliformes totais, 9 (37.5%) coliformes termotolerantes e 5 (20.8%) para *Escherichia coli*. O ponto A4, apresentou maior contaminação para o grupo coliforme e *Enterococcus* spp em 11900 UFC/100ml e 70 UFC/100ml, respectivamente. Para bactérias aeróbias mesófilas a maior contaminação foi verificada no ponto A1, em $23,11 \cdot 10^2$ UFC/mL e para psicrotróficos viáveis, foi no ponto B2 em $5,71 \cdot 10^2$ UFC/ml. Não foi detectada a salmonela spp e Estafilacocos coagulase positiva em todas as amostras. Contudo, O gelo usado na conservação do pescado apresenta qualidade insatisfatória para conservar o pescado no que tange aos coliformes e *Enterococcus* spp, mas para *Salmonella* spp e Estafilacocos coagulase positiva esta dentro dos padrões estabelecidos pela legislação.

Palavras-chaves: Pescado, gelo, qualidade microbiológica, bactérias

Abstract

Ice is one of the methods used to preserve fish since it has the ability to maintain its initial properties and prolong its shelf life. However, processing under poor sanitary conditions can affect fish quality and become a risk factor for consumers. The research focused on assessing the microbiological quality of the ice used to conserve fish in the Quelimane-province city of Zambézia. Twelve samples were collected in 3 markets referenced by (A, B and D) and the samples were analyzed in the laboratory of the National Institute of Fish Inspection of Quelimane. Total coliforms, thermotolerant, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. *Staphylococcus* spp and the presence of *Salmonella* spp. Were also identified and quantified. For the identification and quantification of coliforms and *Enterococcus* spp, the filter membrane technique was used. The surface sowing technique was used for the identification and quantification of *Staphylococcus* coagulase positive and for detection of *Salmonella* spp. Ten (41.7%) of total coliforms, 9 (37.5%) thermotolerant coliforms and 5 (20.8%) were confirmed for *Escherichia coli*. The A4 point presented higher contamination for the coliform group and *Enterococcus* spp. With approximately 11900 CFU/100mL and 70 CFU/100mL, respectively. For mesophilic aerobic bacteria the highest contamination was verified at point A1, with approximately $23,11 \times 10^2$ CFU/mL and for viable psychrotrophs, it was at point B2 with about 5.71×10^2 CFU/mL. No salmonella spp and *Staphylococcus* coagulase positive were detected in all samples. However, ice used for fish preservation is unsatisfactory to preserve fish in relation to coliforms and *Enterococcus* spp. However, for *Salmonella* spp and *Staphylococcus* spp this is within the standards set by legislation.

Keywords: Fish, Ice, Microbiological quality, Bacterium

Lista de abreviaturas

| | |
|-----------------------|--|
| n.^o | Numero |
| °C | Graus celsius |
| mL | Mililitro |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| NMP | Numero Mais Provável |
| UFC | Unidade Formadora de colónias |
| ± | Mais ou menos |
| < | Menor |
| LIP | Laboratório de Inspeção do pescado |
| % | Percentagem |
| ESCMC | Escola Superior de Ciências Marinhas e Costeiras |
| µm | Micrómetro |

Lista de figuras

| | |
|---|---|
| Figura 1. Conservação do pescado a gelo. (Fonte: Marinho, 2011)..... | 4 |
|---|---|

| | |
|---|----|
| Figura 2. Ilustração de maneira errada e certa de colocar gelo no pescado. (Fonte: Marinho, 2011)..... | 5 |
| Figura 3. Localização geográfica da área de estudo. (Fonte: INE, 2011)..... | 10 |
| Figura 4. Colónias típicas a esquerda e confirmação de coliformes totais e termotolerantes turvação do meio com a produção de gás a direita. (Fonte: Dados de pesquisa)..... | 12 |
| Figura 5. Colónias presuntivas no meio SB a esquerda; colónias confirmadas no meio Bile-aesculin-azida ágar a direita (Fonte: Dados de pesquisa)..... | 13 |
| Figura 6. Resultado do plaqueamento em Ágar <i>Baird Parker</i> para isolamento de <i>Estafilacocos</i> coagulase positiva. (Fonte: Dados de pesquisa, 2017)..... | 14 |
| Figura 7. Colecta de amostras. (Fonte: Dados de pesquisa, 2017)..... | 27 |
| Figura 8. Fragmentação do gelo com recurso a ferro e faca. (Fonte: Dados de pesquisa, 2017)..... | 27 |

Lista de tabelas

| | |
|---|---|
| Tabela 1. Parâmetros microbiológicos para a água tratada destinada ao fabrico do gelo. (Fonte: Instituto Nacional de Inspeção do pescado, 2010)..... | 7 |
|---|---|

| | |
|---|----|
| Tabela 2. Registo de recolha de dados no campo. (Fonte: Dados da pesquisa, 2017)..... | 11 |
| Tabela 3. Identificação e Quantificação de coliformes. (Fonte: Dados da pesquisa, 2017)..... | 16 |
| Tabela 4. Microrganismos totais heterotróficos mesófilos e psicrotróficos viáveis encontrados em amostras de gelo utilizado na conservação de pescado. (Fonte: Dados da pesquisa, 2017)..... | 17 |
| Tabela 5. Materiais, meios de cultura, reagentes e equipamentos usados na pesquisa. (Fonte: Dados da pesquisa, 2017)..... | 26 |

Lista de equações

| | |
|---|----|
| Equação 1:Coliformes..... | 25 |
| Equação 2:Bactérias aeróbias viáveis..... | 26 |

Índice Geral

Conteúdo

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 1 | 1 |
| I.INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS | 1 |
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1. Problematização..... | 2 |
| 1.2. Justificativa..... | 2 |
| 1.3. Objectivos..... | 3 |
| 1.3.1. Objectivo Geral..... | 3 |
| CAPÍTULO 2 | 4 |
| II.REVISÃO DA LITERATURA | 4 |
| 2.1. Conservação do Pescado..... | 4 |
| 2.2. Qualidade microbiológica do gelo..... | 6 |
| 2.2.1. Parâmetros de qualidade microbiológica do gelo..... | 6 |
| 2.3. Coliformes..... | 7 |
| 2.5. Bactérias mesófilos totais..... | 8 |
| 2.6. Bactérias psicotróficos totais..... | 8 |
| 2.7. Estafilacocos coagulase positiva..... | 9 |
| 2.8. <i>Salmonella</i> spp..... | 9 |
| CAPITULO 3 | 10 |
| III. METODOLOGIA | 10 |
| 3.1. Área de estudo..... | 10 |
| 3.2. Colecta de amostras..... | 11 |
| 3.3. Analise Microbiológica..... | 12 |
| 3.3.1. Identificação e quantificação de coliformes totais, termotolerantes e <i>E.coli</i> | 12 |

| | |
|---|----|
| 3.3.1.2. Confirmação de coliformes totais, termotolerantes e <i>E.coli</i> | 12 |
| 3.3.2. Identificação e quantificação de <i>Enterococcus</i> spp..... | 13 |
| 3.3.4. Quantificação de bactérias aeróbias viáveis (22 e 6.5 °C)..... | 13 |
| 3.3.5. Detectar a presença de <i>Salmonella</i> spp..... | 13 |
| 3.3.6. Identificação e quantificação de Estafilacocos coagulase positiva..... | 14 |
| 3.5. Tratamento dos dados..... | 15 |
| CAPITULO 4 | 16 |
| IV. Resultados | 16 |
| 4.1. Identificação e quantificação de coliformes (totais, termotolerantes e <i>E. coli</i>)..... | 16 |
| 4.2. Quantificação de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficos viáveis..... | 17 |
| CAPITULO 5 | 18 |
| V. DISCUSSÃO | 18 |
| 5.1. Identificação e quantificação de coliformes (totais, termotolerantes e <i>E. coli</i>) e <i>Enterococcus</i> spp..... | 18 |
| 5.2. Quantificação de microrganismos totais heterotróficos mesófilos e psicrotróficos viáveis..... | 19 |
| CAPÍTULO 5 | 21 |
| V. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES | 21 |
| 5.1. Conclusão..... | 21 |
| 7. Anexos..... | 26 |

CAPÍTULO 1

I.INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

1. Introdução

O pescado é um alimento de excelente valor nutritivo devido a sua proteína de alto valor biológico, vitaminas e ácidos gordos insaturados. Todavia, é bastante perecível e necessita de uma forma de conservação (Germano *et al.*, 2001 e Franco & Landgraf, 2004).

Existem cerca de 20 métodos de conservação que podem ser aplicados ao pescado cujo papel é de manter as suas propriedades iniciais e prolongar o seu tempo de prateleira (Pires, 2006). O gelo é um dos métodos usado para conservar o pescado principalmente em países tropicais (Moçambique), pois, tem a capacidade de evitar ou retardar as reacções químicas-enzimas envolvidas no processo de autólise e o desenvolvimento bacteriano que contribui para a deterioração do pescado (Scherer *et al.*, 2004 e Vieira e Saker-Sampaio, 2004).

O gelo utilizado na conservação do pescado deve ser de óptima qualidade microbiológica, pois se não for pode afectar a qualidade do pescado. A qualidade do gelo pode ser influenciada pelo uso de água contaminada, equipamentos (máquina de fazer gelo, triturador, recipientes de acondicionamento do gelo e utensílios de manuseamento), hábitos não higiénicos dos manipuladores, poeiras e resíduos durante o processo de congelamento e armazenagem (Rio, 2004, Sherer *et al.*, 2004, Lateef *et al.*, 2006, Giampietro e Rezende-Lago, 2009, Mendes, 2009 e Baldin, 2011).

Durante a cadeia de produção, o gelo pode não receber a devida atenção, pela crença de que o frio tem capacidade de eliminar os microrganismos contaminantes. Contudo, pode ser uma via de contaminação do pescado pois, os microrganismos podem sobreviver e na fase de derretimento tendem a recuperar a sua viabilidade (Giampietro e Rezende-Lago, 2009 e Baldin, 2011) e colocar em risco a saúde dos consumidores vulneráveis (Fehd, 2005, Falcão *et al.*, 2002).

Nos mercados da cidade Quelimane é comum o uso do gelo caseiro para conservar o pescado fresco. Contudo, a fraca fiscalização sanitária na cadeia de produção pode comprometer a sua qualidade, conseqüentemente a qualidade do pescado e por em risco a saúde pública. Deste modo, a pesquisa

contribuirá na expansão do conhecimento científico, auxílio a novas pesquisas e prevenções de doenças transmitidas pelo pescado.

Diante disso, a pesquisa teve como objectivo, avaliar a qualidade microbiológica do gelo utilizado na conservação do pescado na cidade de Quelimane – Província da Zambézia.

1.1. Problematização

O gelo, apesar de não ser um meio de cultivo, devido à falta de nutrientes necessários ao desenvolvimento microbiano, poderá funcionar como um veículo de contaminação ao pescado e comprometer sua qualidade. (Brasil, 2003).

Em Moçambique, sobretudo na província da Zambézia, cidade de Quelimane, trabalhos científicos relacionados com a qualidade microbiológica do gelo são escassos. Por essa razão ainda se desconhece sobre a real situação do processamento do gelo.

De acordo com os pressupostos acima descritos, o presente estudo pretende responder a seguinte pergunta de pesquisa:

Será que o gelo usado na conservação do pescado na cidade de Quelimane apresenta qualidade microbiológica satisfatória?

1.2. Justificativa

O gelo é um produto resultante da solidificação da água potável, pode ser ingerido directamente ou ser usado para refrigerar os alimentos, por isso, são exigidos os mesmos cuidados de produção de qualquer alimento (Mendes, 2009),

Segundo [CITATION Ava11 \l 1033], o gelo é um dos métodos usados para conservar o pescado, uma vez que retarda a multiplicação de bactérias. Contudo, se for fabricado em condições sanitárias inadequadas pode tornar-se um potencial veículo de transmissão de muitas doenças infecciosas (Mendes, 2009).

As doenças de origem alimentar são reconhecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um dos maiores problemas de saúde pública e estima-se que cerca de centenas e milhares de pessoas no mundo inteiro sejam vítimas de doenças transmitidas por alimentos (Godoy *et al.*, 2003). Dai a grande importância da qualidade do gelo, traduzida na adopção de rigorosas práticas higiénicas em sua fabricação, manuseio, embalagem, conservação e distribuição.

A utilização do gelo contaminado pode desencadear em várias doenças. Um estudo realizado em Peru, mostrou que o gelo contaminado na comercialização de bebidas e alimentos foi uma das causas de

transmissão de cólera, causando um dos maiores surtos no país (Alves *et al.*, 2013). Um outro caso foi registado Em Lampang e Chiang Rai, na Tailândia, onde foi notificado um surto de hepatite A que afetou cerca de novecentas pessoas (Fehd, 2005).

Mediante a importância deste produto na conservação do pescado e também em relação a escassez de pesquisas que versem sobre a qualidade do gelo na província da Zambézia, especificamente na cidade Quelimane, Faz-se necessário, o desenvolvimento de uma pesquisa no que concerne, a qualidade microbiológica do gelo, fornecendo subsídios aos vendedores e público consumidor sobre os possíveis riscos que esse produto pode oferecer.

1.3. Objectivos

1.3.1. Objectivo Geral

- ✓ Avaliar a qualidade microbiológica do gelo utilizado na conservação do pescado nos mercados da cidade Quelimane – Província da Zambézia.

1.3.2. Específicos

- ✓ Identificar e quantificar, os coliformes (totais, termotolerantes e *Escherichia coli*), *Enterococcus* spp e Estafilacocos coagulase positiva;
- ✓ Quantificar bactérias totais heterotróficos mesófilos e psicrotróficos viáveis;
- ✓ Detectar a presença de *Salmonella* spp no gelo utilizado para a conservação do pescado.

CAPÍTULO 2

II. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Conservação do Pescado

Pescado é todo animal retirado do ambiente aquático, na qual o homem considera como alimento e pode ser consumido directamente ou aproveitado para a industrialização, podendo ser marinho ou de água doce (Pires, 2006). O pescado, integra o grupo dos alimentos altamente perecíveis, por essa razão necessita de ser conservado logo após a sua captura (Ogawa, 1999). Os métodos de conservação mais usados são: secagem, salga, defumação e utilização do frio (congelamento, refrigeração a gelo). A conservação tem o papel de manter as propriedades iniciais e prolongar o tempo de prateleira do pescado (Pires, 2006).

O gelo é um dos métodos tradicionais mais apropriado para conservar o pescado e com maior uso em países tropicais, por exemplo, Moçambique (Oetterer *et al.*, 2010). Este método serve de base e auxílio de outros métodos, pelo facto de preservar temporalmente até que outro método seja aplicado (Germano *et al.*, 2001). O gelo, tem a capacidade de evitar ou retardar as reacções químicas-enzimas envolvidas no processo de autólise e o desenvolvimento bacteriano que contribuem para a deterioração do pescado (Scherer *et al.*, 2004 e Vieira e Saker-Sampaio, 2004).



Figura 1. Conservação do pescado a gelo. (Fonte: Marinho, 2011).

A quantidade do gelo necessária para manter o pescado em refrigeração depende da temperatura inicial do pescado, do peso do pescado, do tempo que se pretende mantê-lo refrigerado e da temperatura

ambiente envolvente. O gelo não só basta estar em quantidade, mas sim, deve cobrir todo pescado conforme mostra a figura 2. Geralmente a proporção de 3:1 (pescado e gelo) é indicada como a ideal, mas quanto maior for a quantidade do gelo melhor será refrigerado o pescado. Para isso, convém ter sempre junto do pescado gelo extra, para o poder adicionar (Pires, 2006).

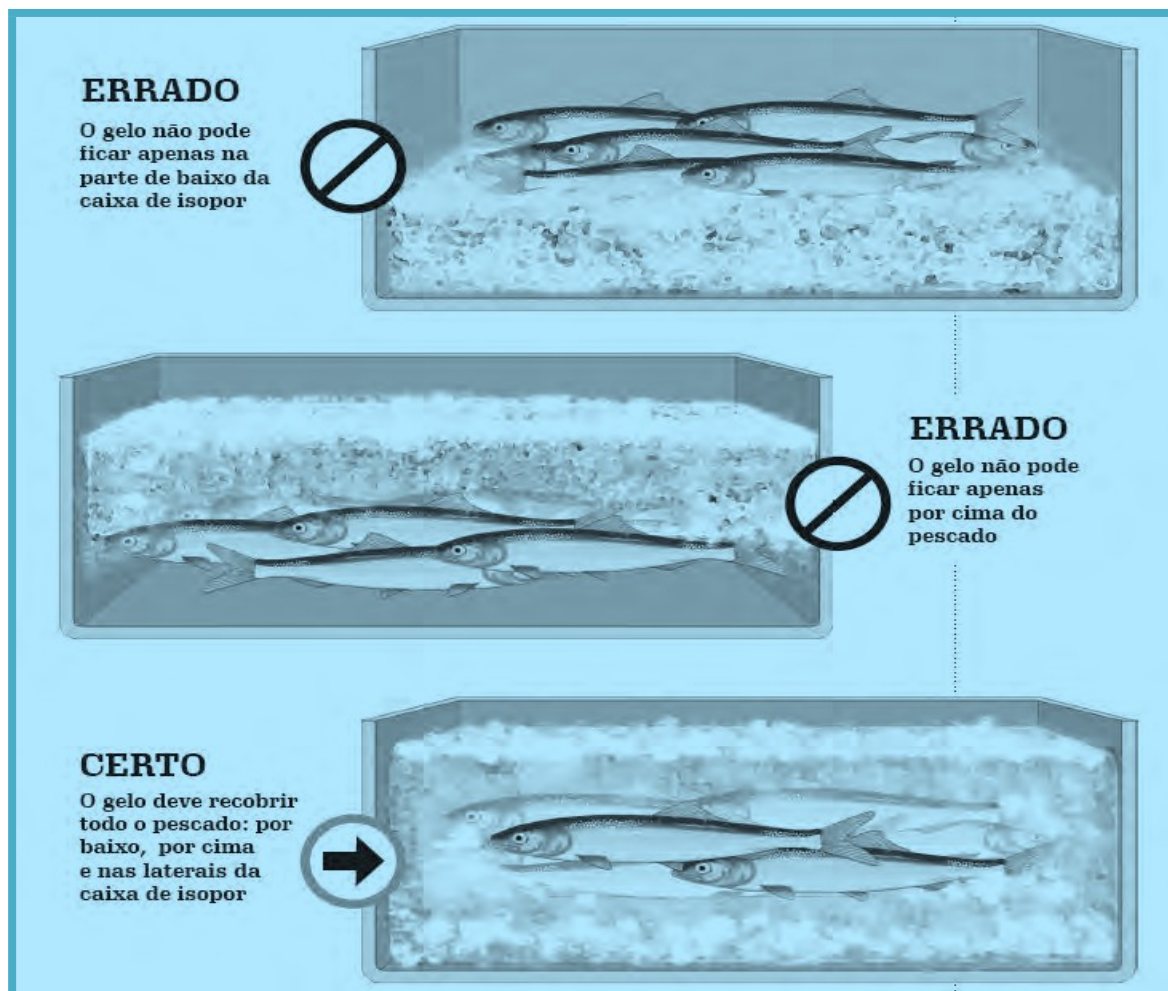


Figura 2. Ilustração de maneira errada e certa de colocar gelo no pescado. (Fonte: Marinho, 2011).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 2004, Vários países ainda não dispõem de normas de qualidade do gelo, sendo assim, usado as normas recomendados para a água de consumo. Em Moçambique, o Diploma Ministerial n.º 180/2004 de 15 de Setembro, do Ministério da Saúde, define os valores máximos permissíveis para as características microbiológicas, organolépticas, físicas e químicas da água potável.

2.2. Qualidade microbiológica do gelo

O termo qualidade microbiológica do gelo, refere-se aos aspectos de segurança, tais como, a ausência de bactérias patogênicas que não possam causar doenças ao ser humano e responsáveis pela deterioração dos alimentos (Germano, 2003).

A contaminação do gelo pode advir dos seguintes modos: pela água contaminada, equipamentos (máquina de fazer gelo, triturador, recipientes de acondicionamento e utensílios de manuseamento), hábitos não higiênicos dos manipuladores, poeiras e resíduos durante o processo de congelamento e armazenagem (Rio, 2004, Sherer, 2004, Lateef *et al.*, 2006, Mendes, 2009, Giampietro e Rezende-Lago, 2009 e Baldin, 2011).

O gelo, apesar de não ser um meio de cultivo, devido à falta de nutrientes necessários ao desenvolvimento bacteriano. Muitos microrganismos tais como, mesófilos e psicrotróficos podem sobreviver no gelo e a medida que vai derretendo ou quando é submetido a conservação do pescado recuperaram a sua viabilidade, e contaminam o pescado (Giampietro e Rezende-Lago, 2009 e Baldin, 2011).

2.2.1. Parâmetros de qualidade microbiológica do gelo

Para se verificar o controle de qualidade da água para vários fins, como por exemplo, produção do gelo devem ser analisados os seguintes parâmetros: Coliformes (totais, termotolerantes e *E.coli*), *Enterococcus* spp, *Salmonella* spp, Estafilococos coagulase positiva, bactérias totais heterotróficos mesófilas e psicrotróficos viáveis. Dentre estes parâmetros, Os coliformes são classificados como indicadores de contaminação, pelo que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação fecal, sobre a provável presença de patógenos (*Salmonella* spp, Estafilococos coagulase positiva) ou sobre a deterioração potencial de um alimento (bactérias totais heterotróficos mesófilos e psicrotróficos) e podem indicar condições sanitárias inadequadas durante a cadeia de produção até a comercialização (Franco e Landgraf, 2005).

Estes microrganismos indicadores podem ser utilizados para avaliar a qualidade microbiológica dos alimentos em relação à vida de prateleira e a segurança dos alimentos.

Os microrganismos indicadores podem ser agrupados em: microrganismos que não oferecem riscos à saúde do homem (mesófilos, psicrotróficos, termófilos, bolores e leveduras) e microrganismos que oferecem um risco baixo ou indireto à saúde (coliformes totais, coliformes fecais, *Enterococcus*, enterobactérias totais, *Escherichia coli*). Os coliformes são classificados como indicadores de contaminação pois, podem

fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação fecal, provável presença de patógenos (*Salmonella* spp, Estafilacocos coagulase positiva) deterioração potencial de um alimento (bactérias totais heterotróficos mesófilas e psicrotróficos) e condições sanitárias inadequadas durante a cadeia de produção até a comercialização (Franco e Landgraf, 2005).

O Diploma Ministerial nº 145/2010, de 24 de Agosto, do Ministério das pescas (actual Ministério do Mar, Águas Interiores e Pescas), estabelece limites apenas para coliformes, *Enterococcus* spp, *Vibrio cholerae* e *Salmonella* spp (tabela 1). Para outras bactérias como heterotróficos mesófilos e psicrotróficos viáveis não devem ultrapassar $5,0 \times 10^2$ UFC/mL (Brasil, 2004). Para Estafilacocos coagulase positiva devem ser ausentes em cada 1000ml (Albuquerque *et al.*, 2006).

Tabela 1. Parâmetros microbiológicos para a água tratada destinada ao fabrico do gelo. (Fonte: Instituto Nacional de Inspeção do pescado, 2010).

| Parâmetros Microbiológicos | Valores paramétricos (limites) | Unidades |
|--|--------------------------------|-------------|
| <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) | 0 | UFC/100 mL |
| <i>Enterococos</i> | 0 | UFC/100 mL |
| <i>Salmonella</i> spp | Ausente | UFC/1000 mL |
| <i>Vibrio cholerae</i> | 0 | UFC/1000 mL |

2.3. Coliformes

O grupo coliforme compreende os seguintes subgrupos: totais, termotolerantes e *E.coli* (Buzanello *et al.*, 2008). Coliformes totais são um grupo de bactérias que tem a forma de bastonetes, bacilos, gram-negativos, aeróbios facultativos que fermentam a lactose a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, produzindo gás num prazo de 24-48 horas (Brasil, 2004). Os coliformes totais compreendem a família Enterobacteriaceae, representada pelos géneros: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter* (Geus e Lima, 2008). Podem ocorrer no meio ambiente, nas fezes humanas, em águas com alta concentração de matéria orgânica, solo ou vegetação em decomposição (Carvalho *et al.*, 2005).

A presença de coliformes totais é frequentemente atribuída às práticas precárias de higiene no processo de manipulação (Moreno *et al.*, 1999).

A definição dos coliformes termotolerantes é semelhante à de Coliformes totais, mais, são capazes de produzir gás a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas. Os coliformes termotolerantes, são representados por três géneros, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. As cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* não são

necessariamente de origem fecal e podem habitar na água ou no solo que não tenham recebido contaminação fecal recente. O género *Escherichia* é representado pela espécie *Escherichia coli*, essa espécie é exclusivamente fecal, habita nas fezes dos animais de sangue quente incluindo o homem (Muratori *et al.*, 2007). Para além de ser classificada como indicador de contaminação, a *Escherichia coli* classifica-se como agente patogênico para o homem (Insalata, 1973). A doença causada por este agente é designada de síndrome hemolítico-urêmica (SHU). Esta doença pode destruir as células vermelhas e causar insuficiência renal principalmente em crianças com menos de 5 anos. A maioria das pessoas que têm a SHU podem consistir em urina menos frequente e sensação de cansaço. A *Escherichia coli* transmite-se através de alimentos contaminados que não foram pasteurizados, lavados ou devidamente cozinhados, bem como fezes de uma pessoa infectada que não lavou bem as mãos com água e sabão após usar o banheiro (Boston Public Health Commission, 2014).

2.4. *Enterococcus spp*

As bactérias do género *Enterococcus spp* são cocos gram-positivos, catalase negativo com capacidade de crescer entre 5 e 50°C, a temperatura óptima é de $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ em condições aeróbicas embora o desenvolvimento possa também ocorrer em condições anaeróbicas (Barros, 2014). Possuem duas espécies representativas, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* e o principal habitat é o trato gastrointestinal, porém, pode ser encontrado na cavidade oral, vesícula biliar, vagina, uretra masculina, no solo, em alimentos e na água (Horner *et al.*, 2005).

2.5. Bactérias mesófilos totais

Grupo de bacterias, capazes de crescerem em meios não seletivos ricos em nutrientes e se multiplicarem entre 10 e 45°C, sendo o crescimento óptimo a 30°C. São utilizadas como indicadores microbiológicos da qualidade dos alimentos, indicando condições higiênico-sanitárias durante a cadeia de produção (Silva, 2012). A sua presença em alimentos, traz como consequências perdas económicas e riscos à saúde do consumidor.

2.6. Bactérias psicrotróficos totais

Grupo de bactérias, capazes de se multiplicarem, abaixo de 7°C, mas a temperatura óptima de crescimento se situa entre 20 e 30°C (Furtado, 2005). Os principais géneros são: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Clostridium*. Essas bactérias são normalmente encontradas na água e em vasilhames que não foram lavados adequadamente (Oliveira *et*

al., 2012). São bactérias responsáveis pela deterioração dos alimentos conservados sob refrigeração (Jay, 2005).

2.7. Estafilococos coagulase positiva

São cocos gram-positivos, coagulase-positivo, oxidase-negativo, anaeróbio facultativo com forma semelhantes a cachos de uva, destacando-se o *S. aureus*, (Quinn *et al.*, 2005). São habitantes usuais da boca, mãos, orelhas das membranas mucosas (exemplo nariz) e do trato respiratório superior, (Germano, 2001 e Albuquerque, 2006). Este microrganismo pode causar intoxicações alimentares designadas de gastroenterites estafilocócicas que são disseminadas a medida que se espirra, tosse, assobia ou ao se assoar o nariz. Portanto, para se evitar estas intoxicações é necessário que os manipuladores obtêm em boas práticas como: não provar alimentos com os dedos, ao assoar o nariz usar lenços descartáveis e lavar as mãos após o ato (Nascimento *et al.*, 2000). A presença deste microrganismo em alimentos constitui uma soma de falhas higiênicas e da temperatura mal controlada (Evangelista, 2001).

2.8. *Salmonella* spp

Gênero de bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae, são gram-negativa, a maioria possuem flagelos que lhes permite moverem-se e são anaeróbicos facultativos. A sua temperatura de multiplicação varia de 5 a 46°C com temperatura ótima de crescimento de 37°C (Fernandes, 2014). O gênero *salmonella* divide-se em duas espécies: *salmonella entericae* *salmonella bongori* cujo seu habitat natural é exclusivamente o trato intestinal dos animais incluído o homem e podem desencadear em uma doença designada de salmonelose (Franco e Landgraf, 2004). Em pacientes imunodeprimidos, esta doença pode ser assintomática ou ainda determinar diarreia autolimitada em 95% dos casos (Brasil, 2011). Os sintomas consistem em náuseas, vômitos, dores abdominais, dor de cabeça, calafrios diarreia. Esses sintomas são acompanhados por fraquezas, fadiga muscular, febre moderada, nervosismo e sonolência, que persistem por 2 a 3 dias. Estes sintomas surgem em torno de 12 a 14 horas após a ingestão dos alimentos contaminados (Jay, 2005).

CAPITULO 3

III. METODOLOGIA

3.1. Área de estudo

O estudo foi feito na cidade de Quelimane, em 3 mercados referenciados por A, B e D. A cidade Quelimane situa-se na latitude $17^{\circ} 52' 35.63''$ Sul, longitude $36^{\circ} 53' 33.59''$ Este. Esta situada na província da Zambézia, zona centro de Moçambique (Google earth, 2017). Esta cidade, tanto a Norte, Sul, Este e Oeste é limitada pelo distrito de Nicoadala.

Segundo os dados do III recenseamento geral da população e habitação de 2007, a cidade possuía uma população de 219, 014 habitantes e uma densidade de 79.8 indivíduos/Km² (INE, 2007).

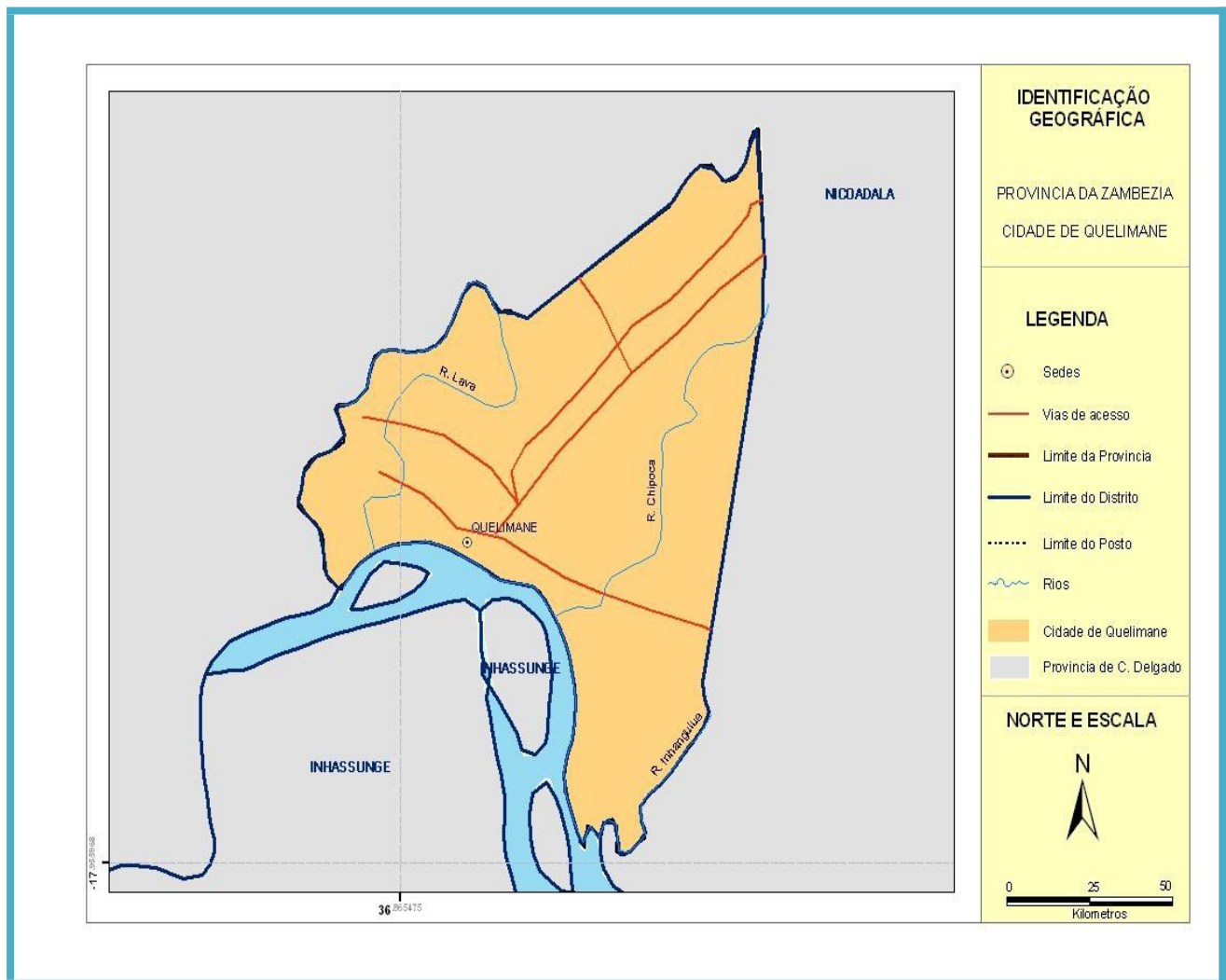


Figura 3. Localização geográfica da área de estudo. (Fonte: INE, 2011).

Estes mercados são os mais frequentados pelos munícipes sejam por apresentarem uma diversidade de pescado e manutenção das tradições. Nestes mercados vendem pescado, seco, congelado e fresco. O pescado fresco é comercializado em bacias, onde adicionam o gelo proveniente das casas próximas aos mercados.

3.2. Colecta de amostras

A amostragem foi feita no período de Junho a Julho de 2017. Em cada mercado foram colhidas 4 amostras de gelo, totalizando 12 amostras de acordo com o calendário de amostragem (tabela 2). As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis previamente codificadas (data, hora, local de colheita) e posteriormente foram transportadas num colmam isotérmico até o laboratório de inspecção do pescado (LIP), onde foram conservadas na geleira a 4°C durante 10 horas para o degelo.

Tabela 2. Registo de recolha de dados no campo. (Fonte: Dados da pesquisa, 2017).

| Gelo | Nº de amostra | Data | Hora |
|------|---------------|------------|-------|
| A | 1 | 15/07/2017 | 06:43 |
| | 2 | 15/07/2017 | 06:48 |
| | 3 | 15/07/2017 | 06:54 |
| | 4 | 15/07/2017 | 06:56 |
| B | 1 | 27/07/2017 | 06:02 |
| | 2 | 27/07/2017 | 06:06 |
| | 3 | 27/07/2017 | 06:33 |
| | 4 | 27/07/2017 | 06:43 |
| D | 1 | 15/08/2017 | 06:02 |
| | 2 | 15/08/2017 | 06:06 |
| | 3 | 15/08/2017 | 06:27 |
| | 4 | 15/08/2017 | 06:33 |

3.3. Analise Microbiológica

3.3.1. Identificação e quantificação de coliformes totais, termotolerantes e *E. coli*

Presuntiva: Os coliformes foram analisados pelo método de membrana filtrante de acordo com o PTM 01, onde: foram filtrados 1 e 10 ml de amostra num sistema de filtração e as membranas (0,45 µm) foram colocadas nas respectivas placas de Petri (60x15mm) previamente codificadas, contendo M-Endo Agar Less. De seguida, as placas foram incubadas a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 24 ± 2 horas. Após a incubação, fez-se a contagem das colónias atípicas e típicas de coliformes (coloração rosa a vermelho escura e brilho verde metálico).

3.3.1.2. Confirmação de coliformes totais, termotolerantes e *E. coli*

Foram seleccionadas em cada placa 5 colónias típicas e 5 colónias atípicas. Com auxílio da ansa bacteriológica foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10ml de Lactose *broth* para a confirmação de coliformes (totais, termotolerantes) e 10 ml de triptone *water* para confirmação de *E. coli*. A inoculação no Lactose *broth* foi feita em duplicado, onde um grupo de tubos foi incubado a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 ± 2 horas para a confirmação de coliformes totais e outro grupo foi incubado no banho-maria a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas para a confirmação de coliformes termotolerantes. Os tubos contendo triptone *water* foram incubados no banho-maria a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas. Após a incubação fez-se a leitura. Para coliformes totais e termotolerantes, foram considerados positivos os tubos que apresentavam desenvolvimento microbiano caracterizado por turvação do meio com a produção de gás. Para *E.coli*, adicionou-se 0.3ml de reagente de *kovac's* no triptone *water* e era apurado como positivo a presença de um anel de cor vermelha na superfície do meio.

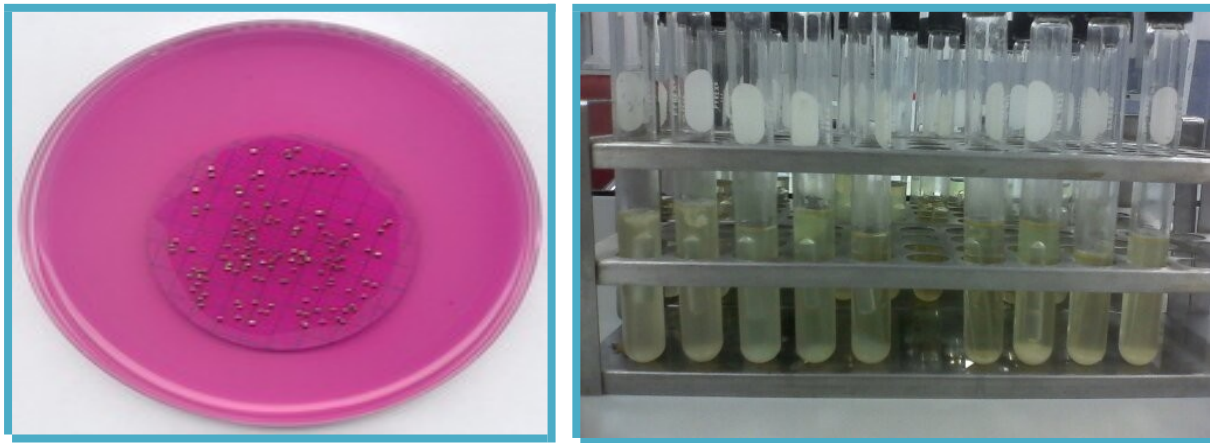


Figura 4. Colónias típicas a esquerda e confirmação de coliformes totais e termotolerantes turvação do meio com a produção de gás a direita. (Fonte: Dados de pesquisa).

3.3.2. Identificação e quantificação de *Enterococcus spp*

Foram analisados pelo método de membrana filtrante de acordo com o PTM 02, Onde: foram filtrados 1 e 10 ml de amostra num sistema de filtração (composto por uma bomba de sucção) e as membranas (0,45 μm) foram colocadas nas respectivas placas de Petri (60x15mm) previamente codificadas, contendo *Slanetz and Bartley* (SB). De seguida, as placas foram incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 48 ± 4 horas. Após a incubação, fez-se a contagem das colónias típicas de *Enterococcus* (com a cor vermelho marrom ou rosa) presentes na membrana.

Com auxílio de uma pinça transferiu-se a membrana com as colónias típicas para uma placa contendo Bile-aesculin-azida, previamente pré-aquecida a temperatura de $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Incubou-se as placas a $44 \pm$

0.5°C durante 2 horas ao fim deste tempo retirou-se as placas e contou-se as colónias que apresentaram difusão de cor castanho-escura em redor da colónia.

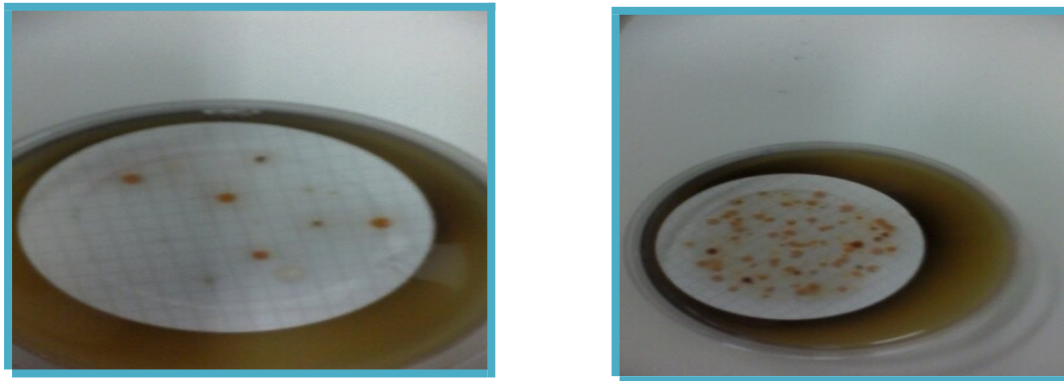


Figura 5. Colónias presuntivas no meio SB a esquerda; colónias confirmadas no meio Bile-aesculin-azida ágar a direita (Fonte: Dados de pesquisa).

3.3.4. Quantificação de bactérias aeróbias viáveis (22 e 6.5°C)

Para a quantificação das bactérias aeróbicas a 22 e 6.5°C, transferiu-se 1mL da amostra para um tubo de ensaio contendo 9 ml de água peptonada, onde obteve-se a diluição 10^{-1} , e transferiu-se 1ml da diluição 10^{-1} para 9ml de água peptonada e obteve-se a diluição 10^{-2} . De seguida foram pipetados em duplicado 1ml das diluições (10^0 , 10^{-1} e 10^{-2}) para respectivas placas de Petri (90x15mm) previamente codificadas e posteriormente dispensou-se 15-20mL de *Yeast extract agar*. Um grupo de placas foi incubado a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 68 ± 4 horas e o outro foi incubado a $6,5^\circ\text{C}$ durante 10 dias. Após a incubação fez-se a contagem das colónias efetuadas com o auxílio de uma conta colónias.

3.3.5. Detectar a presença de *Salmonella* spp

Pre-enriquecimento: Foi transferido 25mL de cada amostra para 225mL de água peptonada a 1% tamponada (BPW) para posterior incubação a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 18 ± 3 horas.

Enriquecimento: Transferiu-se uma alíquota de 1mL e foi inoculado para tubos contendo caldo *Rappaport-Vassiliadis* e incubaram-se a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 3 horas.

Isolamento: Findo a incubação, 0,1mL de *Rappaport-Vassiliadis* foram estriados com alça de platina na superfície de placas contendo ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) e incubados a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 3 horas. Após a incubação, fez-se a leitura de colónias típicas que consistia em ver colónias (transparentes, cor-de-rosa escuro, com centro preto e uma zona avermelhada. Cepas fortemente produtoras de ácido sulfídrico (H_2S) podem produzir colónias com centro preto grande e brilhante, ou mesmo inteiramente pretas). Cepas de *Salmonella* H_2S negativas produzem colónias cor-de-rosa com

centro rosa mais escuro, mas não preto. A confirmação foi feita com base no teste API 20E, de acordo com as instruções do fabricante.

3.3.6. Identificação e quantificação de Estafilacocos coagulase positiva

Transferiu-se, 0,1ml da amostra para placas contendo *Baird-parker* Ágar e com auxílio da alça de *Drigalski*, o inóculo foi espalhado na superfície do meio. De seguida as placas permaneceram a temperatura ambiente durante 15 minutos para secarem. Posteriormente incubadas a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas ± 4 . Após a incubação foi feita a leitura, onde foram contadas todas colónias típicas (negras, brilhantes, com zona de precipitação ao redor e circundadas) e atípicas (somente negras e brilhantes).

Confirmação: Em seguida seleccionou-se cinco (5) colónias de cada tipo e foram inoculadas em BHI e foram Incubados a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 ± 2 horas. Após a incubação, fez-se o teste de coagulase, onde foram transferidos 0,1 ml do inóculo proveniente do BHI para um tubo de ensaio contendo 0,3mL do plasma do coelho e incubou-se a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 3 horas. Após a incubação fez-se a leitura. A coagulação do plasma de coelho confirma a presença de estafilococos coagulase positiva.



Figura 6. Resultado do plaqueamento em Ágar *Baird Parker* para isolamento de Estafilacocos coagulase positiva. (Fonte: Dados de pesquisa, 2017).

3.4. Expressão dos resultados

Para coliformes e *Enterococcus* foram expressos, pela seguinte equação:

$$NC = \frac{Ct * Cp}{Cs}$$

Equação

1

Onde:

N.C. - Numero de colónias;

C. t – Colónias totais;

C. p - Colónias positiva;

C. s- Colónias seleccionadas;

Nota: O resultado se expressa por 100mL.

Para bactérias aeróbias viáveis, foram expressos, pela seguinte equação:

$$N = \frac{n}{V \cdot d} \left[\frac{UFC}{mL} \right]$$

Equação 2

Onde:

N- Numero de colónias;

V-Volume pipetado

d- Diluição

n- colónias totais;

UFC- Unidade formadora de colónias;

mL- Mililitro.

3.5.Tratamento dos dados

Os dados foram processados no pacote de *Microsoft Office Excel 2007*. Os resultados foram apresentados sob forma de tabelas.

CAPITULO 4

IV. Resultados

4.1. Identificação e quantificação de coliformes (totais, termotolerantes e *E. coli*)

Foram identificados o grupo coliformes, em cerca de 66,7% dos quais, coliformes totais foram de 10 (83,3%), seguido pelos coliformes termotolerantes 9 (75%) e *E. coli* com 5 (41,7%). No ponto D3 e D4 não foram identificados coliformes, no ponto B3 e D2 ausência de coliformes termotolerantes e nos pontos A2, A3, B1, B3 e D1 não foram identificados *E. coli* (tabela 3).

Os coliformes apresentaram maior contaminação no ponto A4 com cerca de 11900 UFC/100mL. O ponto B1 apresentou menor contaminação dos coliformes totais e termotolerantes com cerca de 10 UFC/100mL e para *E. coli* o menor número registado foi no ponto D2 (tabela 3).

Foram identificados *Enterococcus*, em todos pontos. O ponto A4 registou maior contaminação com cerca de 70 UFC/100 ml, O ponto A3 registou 10 UFC/100 ml, O ponto B2 registou maior contaminação em cerca de 29 UFC/100mL e B1 e B3 registaram 1 e 2 UFC/100mL. O ponto D1 registou maior contaminação em cerca de 14 UFC/100mL com baixos valores no ponto D2, D3 e D4 com 2, 3 e 1 UFC/100mL, respectivamente (tabela 3).

Tabela 3. Identificação e Quantificação de coliformes. (Fonte: Dados da pesquisa, 2017).

| Parâmetros | (UFC/100mL) | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------|-----|----|------|----|-----|----|-----|-----|-----|---|---|
| | A | | | | B | | | | D | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Coliformes totais | 325 | 336 | 72 | 1190 | 10 | 445 | 40 | 292 | 333 | 120 | 0 | 0 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | |
| Coliformes termotolerantes | 390 | 168 | 60 | 1190 | 10 | 445 | 0 | 292 | 60 | 0 | 0 | 0 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | | 0 | | | | |
| <i>E. coli</i> | 520 | 0 | 0 | 1190 | 0 | 534 | 0 | 534 | 0 | 240 | 0 | 0 |
| | 0 | | | 0 | | 0 | | 0 | | | | |
| <i>Enterococcus spp</i> | 64 | 38 | 10 | 70 | 1 | 29 | 2 | 12 | 14 | 2 | 3 | 1 |

4.2. Quantificação de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficos viáveis

Para bactérias aeróbias mesófilas, Os pontos A1, B2 e D2 registaram maior contaminação com cerca de $23,11 \cdot 10^2$ UFC/mL, $9,82 \cdot 10^2$ UFC/mL e $7,75 \cdot 10^2$ UFC/mL, respectivamente. A menor contaminação foi registada nos pontos A3, B3 e D3, em cerca de $3,63 \cdot 10^2$ UFC/mL, $2,44 \cdot 10^2$ UFC/mL e $3,9 \cdot 10^2$ UFC/mL, respectivamente (tabela 4). Para psicrotróficos, o ponto B2 registou maior contaminação com cerca de $5,71 \cdot 10^2$ UFC/mL. A menor contaminação foi registada nos pontos A4, D3 e B3 com cerca de $10,1 \cdot 10^2$ UFC/mL, $7,4 \cdot 10$ UFC/mL e 1UFC/mL, respectivamente. Nos pontos B1, B3 e D1, D2 não foi detectado bactérias psicrotróficos (tabela 4).

Tabela 4. Microrganismos totais heterotróficos mesófilos e psicrotróficos viáveis encontrados em amostras de gelo utilizado na conservação de pescado. (Fonte: Dados da pesquisa, 2017).

| Fabricas | Nº | Parametros (UFC/mL) | |
|----------|----|---------------------|------------------------|
| | | Mesofilos (22°C) | Psicrotróficos (6,5°C) |
| A | 1 | $23,11 \cdot 10^2$ | $1,44 \cdot 10^2$ |

| | | | |
|----------|---|-----------------------|----------------------|
| B | 2 | 13,10*10 ² | 1,39*10 ² |
| | 3 | 3,63*10 ² | 2,71*10 ² |
| | 4 | 13,55*10 ² | 10,1*10 ² |
| | 1 | 8,94*10 ² | 0 |
| D | 2 | 9,82*10 ² | 5,71*10 ² |
| | 3 | 2,44*10 ² | 1 |
| | 4 | 2,99*10 ² | 0 |
| | 1 | 5,90*10 ² | 0 |
| | 2 | 7,75*10 ² | 0 |
| | 3 | 3,9*10 | 7,4*10 |
| | 4 | 2,59*10 ² | 1,33*10 ² |

Não foi detectada a salmonela spp nem EstafilococosCoagulase positiva em todas as amostras.

CAPITULO 5

V. DISCUSSÃO

5.1. Identificação e quantificação de coliformes (totais, termotolerantes e *E. coli*) e *Enterococcus* spp

Os resultados encontrados nesta pesquisa mostram que os coliformes apresentaram contaminação em cerca 66,7% e *Enterococcus* spp 100% das amostras. A contaminação, provavelmente pode advir dos seguintes factores: uso da água contaminada para o fabrico do gelo e/ou dos hábitos não higiénicos dos comerciantes por exemplo: o gelo era derretido numa água do poço para posterior fragmentação com recurso a um fero enferrujado, e em alguns casos nas bancadas de comercialização húmidas e sujas. Para o acondicionamento, usavam garrafas de óleo vegetal sujas e durante o transporte não havia protecção do gelo. Suspeita-se que todos esses factores sejam veículo de contaminação. (Nichols *et al.*, 2000), afirmam que esses factores são responsáveis pela potencial contaminação do gelo. Nos pontos D3 e D4, B3 e D2, A2, A3, B1, B3 e D1 não foram identificados coliformes totais, termotolerantes e *E. coli*, respectivamente, talvez as condições higiénico-sanitárias foram cumpridas.

A presença de *E. coli* em 5 (41,7%) amostras evidência potencial contaminação fecal, provavelmente resultante da manipulação de gelo ou da utilização de utensílios contaminados (Nichols *et al.*, 2000). A pesquisa desta bactéria é importante, pois, normalmente habita a microbiota do intestino humano.

A presença desta bactéria denuncia a existência de bactérias patogénicas, estas que produzem toxinas causadoras de infecções graves no homem principalmente em crianças, idosos, gestantes e

imunodeprimidos (Silva, 2009) A *E. coli* é um coliforme que não sobrevive durante longo período na água, por isso a sua presença revela-se no melhor indicador de poluição fecal recente (Serrano e Sousa, 2008).

Resultados similares para coliformes, foram observados por, Giampietro e Rezende-Lago (2009), em quatro estabelecimentos comerciais, verificaram que das 30 amostras analisadas, 96,7% (29) e 73,3% (22), apresentaram, respectivamente, contaminação por coliformes totais e termotolerantes. Para Almas, (2010), observou índices de contaminação por *Enterococcus* spp em cerca de 11 (37,93%) com valores entre 1,1 a 9,2 NMP. 100 mL⁻¹.

De acordo com Diploma Ministerial nº 145/2010, de 24 de Agosto, do Ministério do Mar, Águas interiores e pescas, estes resultados não entram em conformidade com os padrões estabelecidos, onde para os coliformes e *Enterococcus* spp devem ser ausentes em 100 UFC/mL.

5.2. Quantificação de microrganismos totais heterotróficos mesófilos e psicotróficos viáveis

Os altos índices de contaminação verificadas nos pontos A1, B2 e D2 por bactérias mesófilas em cerca de 23,11*10² UFC/mL, 9,82*10²UFC/mL e 7,75*10² UFC/mL, respectivamente e por bactérias psicotróficas no ponto B2, pode ser justificado pelo facto do gelo não atingir o ponto máximo de solidificação e também das condições higiénico-sanitárias por exemplo as garrafas não eram lavadas devidamente. Estes microrganismos fornecem informações sobre as características higiénico-sanitárias do processamento e armazenamento do produto.

A contaminação verificada nessa pesquisa mostra claramente que o gelo pode introduzir microrganismos no pescado. Estes microrganismos podem deteriorar o pescado e conseqüentemente reduzir o tempo de prateleira do mesmo. Para além disso pode trazer riscos a saúde da população consumidora como já referenciado por Giampietro e Rezende-Lago (2009) e Baldin (2011).

Vários estudos encontraram resultados acima do presente estudo, por exemplo, Pimentel e Panetta (2003), encontraram bactérias mesófilas que variaram de 3*10³ a 84*10³ UFC/mL, Lateef *et al.* (2006) variaram de 10³ a 21,9*10³ UFC/mL, Giampietro e Rezende-Lago (2009) 10² a 10⁶ UFC/mL e Baldin (2011) 10 a 10⁵ UFC/mL.

Giampietro & Rezende-Lago (2009) observaram a presença de psicrotróficos em 24 amostras que variaram de 10⁵ a 10⁷ UFC/mL.

Os resultados encontrados no presente estudo chamam a atenção das autoridades para uma possível revisão na legislação vigente e a inclusão de um limite máximo aceitável de microrganismos

psicrotróficos e mesófilos na água utilizada na produção de gelo. Porque de acordo com a legislação brasileira de 2004, estes resultados apresentaram contagem superior a 500 UFC/mL.

5.3. Detecção da *Salmonella* spp, identificação e quantificação de Estafilacocos coagulase positiva

Os resultados mostram que não foram detectadas bactérias patogênicas (*salmonella* spp e Estafilacocos coagulase positiva) em todas as amostras. Possivelmente associe-se a não contaminação da amostra e a fraca competição, pois, não crescem na presença de outros microrganismos, por exemplo mesófilos e psicrotrófilos totais viáveis (Huss, 1997).

Os resultados encontrados no presente estudo vão de acordo com os valores observados por Baldin (2009) no município de Ribeirão (Brasil) tendo concluindo que o gelo estava dentro dos padrões quanto à ausência para *Salmonella* spp. De modo contrario, Falcão *et al.* (2002), em Araraquara/SP encontraram uma amostra com género salmonela e tendo afirmado que o gelo pode ser um importante veículo de contaminação por enterobactérias patogênicas apresentando riscos ao consumidor, quando obtido a partir de água contaminada.

Albuquerque *et al.* (2006) e Baldin (2009), isolaram 11 (33,7%) e 25 (39,68%) de Estafilacocos coagulase positiva, respectivamente. Estirpes desta bactéria foram isolados nas amostras utilizadas em feiras livres para conservação de pescado.

Sob o ponto de vista sanitário, o gelo não representa risco de veicular estes patógenos para o pescado, o que o qualifica como próprio para a conservação do pescado em relação a essas bactérias. De acordo com a legislação vigente, *salmonella* spp e Estafilacocos Coagulase positiva, estão dentro dos limites, pois, devem ausentes em 1000mL.

CAPÍTULO 5

V. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES

5.1. Conclusão

Findo a pesquisa, conclui-se:

- ✓ Foram identificados coliformes (66,7%) e *Enterococcus* spp (100%);
- ✓ As bactérias mesófilas e psicotróficas apresentaram 66,7% e 8,3%, respectivamente, das amostras contaminadas com valores acima da legislação;
- ✓ Não foi detectada a *Salmonella* spp nem Estafilococos coagulase positiva em todas as amostras. Apesar da ausência da *salmonella* spp e Estafilococos coagulase positiva, os valores de coliformes encontrados servem de alerta, pois, o gelo pode veicular microrganismos no pescado e contaminar o mesmo, para além de colocar em risco os consumidores;
- ✓ O gelo usado para conservar o pescado na cidade Quelimane não apresenta qualidade microbiológica satisfatória. De acordo com a legislação, as condições de higiene e sanidade são precárias.

5.2. Recomendações

Comunidade académica recomenda-se:

- ✓ Avaliar a água que é usada para fabricar o gelo e a que usam para derreter o gelo.

Aos vendedores:

- ✓ Os manipuladores de gelo devem lavar as mãos frequentemente com água limpa e sabão;
- ✓ Evitar o uso do gelo que não tenha atingido o ponto máximo de congelamento;
- ✓ Proteger o gelo com um plástico limpo durante o transporte;
- ✓ Os recipientes de acondicionamento do gelo devem ser mantidos em condições de higiene e a água derretida deve ser retirada;
- ✓ Usar instrumentos limpos para fragmentarem o gelo

Governo recomenda-se:

- ✓ Orientar, os vendedores quanto às boas práticas de fabricação, manuseio e acondicionamento;

- ✓ Intensificar a fiscalização do gelo nos mercados.

6. Referências bibliográficas

- ✓ Albuquerque, W. F., Vieira, R. H. S. F e Vieira, G. H. F. (2006). Isolamento de *Staphylococcus aureus* do Gelo, Água, Bancadas e Vendedores de Pescado da Feira de Mucuripe, Fortaleza, Ceará. *Revista Ciência Agronômica.*, Fortaleza, v. 37, n. 3, 299-303;
- ✓ Alves, L. M., Pereira, D. G., Rosa, D. D., Gomas Kinappe, L. F., Cereser, N. D., & Pinto, F. D. (2013). Qualidade Microbiológica de gelo comercializado na cidade de Petolas. XXII congresso de iniciação científica da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas;
- ✓ Barros, G. C. Perda de qualidade do pescadodeteriora e putrefação. (2014). *Revista CFMV*, ano IX, no 30, 59-64;
- ✓ Baldin, C. J. (2011). Avaliação da Qualidade Microbiológica do Gelo Utilizado na Conservação de Pescado. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal;
- ✓ Boston, P. H. C. (2014) *Infectious Disease Bureau, Massachusetts*. 534 pp.
- ✓ Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2003). Instrução Normativa n.62, 18 de setembro de Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial da União*, de 18 de setembro de 2003. Seção I, p.14.
- ✓ Brasil. Ministério da Saúde. (2004). Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Portaria n.518, de 25 de março de. *Diário Oficial da União*, de 26 de março de Seção I, p.266;
- ✓ Brasil, Ministério da Saúde. (2011). Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp. 1ª edição, Brasília. 11 pp;
- ✓ Buzanello, E. B., Martinhago, M. W., Almeida, M. M. e Pinto, F. G. S. (2008). Determinação de Coliformes Totais e Termotolerantes na Água do Lago Municipal de Cascavel, Paraná. *Revista Brasileira de Biociências.*, Porto Alegre, v. 6, 59-60;

- ✓ Carvalho, A. C. F. B., Cortez, A. L. L., Salotti, B. M., Bürger, K. P. e Vidalmartins, A. M. C. (2005) Presença de Microrganismos Mesófilos, Psicrotróficos e Coliformes em diferentes amostras de produtos avícolas. *Arquivo do Instituto de biologia.*, São Paulo, v.72, n.3, 303-307;
- ✓ Evangelista, J. *Tecnologia de Alimentos.* (2001) 2ª Edição, São Paulo. 12 pp.
- ✓ Falcão, J. P., Dias, A. M. G., Correa, E. F. e Falcão, D. P. (2002). *Microbiological Quality of Ice Used to Refrigerate Foods. Food Microbiology.*, v. 19, 269-276;
- ✓ Fehd. (2005). *The Microbiological Quality of Edible Ice from Ice Manufacturing Plants and Retail Businesses In Hong Kong. Food and Environmental Hygiene Department.*, 1-27;
- ✓ Fernandes, L. L. e Gois, V. R. (2014). Avaliação das principais metodologias aplicadas às análises microbiológicas de água para consumo humano voltadas para a detecção de coliformes totais e termotolerantes. *Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente.*, 6(2): 49-64;
- ✓ Ferreira, J. M. (2014). Características Microbiológicas do Gelo para Consumo Comercializado no Recôncavo Baiano. Tese de Licenciatura. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia;
- ✓ Frazier, W. C., Westhoff, D. C. (1993). *Microbiologia de los alimentos.* Zaragoza. 4ª edição, Acribia, 677 pp;
- ✓ Franco, B. D. G. M. e Landgraf, M. (2004) *Microbiologia dos Alimentos.* São Paulo, 182 pp;
- ✓ Franco, B. D. G. M., Landgraf, M. M. T. D. (2005). *Microbiologia dos Alimentos.* São Paulo, Ed. Atheneu, 27-171 pp;
- ✓ Furtado, M.M. (2005). Principais problemas dos queijos: Causa e Prevenção. Comunicações e Editora São Paulo, Brasil, 200 pp;
- ✓ Germano, P. M. L. e Germano, M. S. (2001). *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos.* São Paulo 204-208 pp;
- ✓ Geus, J. A. M. e Lima I. A. (2008). Análise de Coliformes Totais e Fecais: Um Comparativo entre técnicas oficiais VRBA e *Petrifilm* EC aplicados em uma indústria de carnes. In: Encontro de Engenharia e Tecnologia dos Campos Gerais, v.2. Brasil. pp 2;
- ✓ Giampietro, A. e Rezende-Lago, N. C. M. (2009). Qualidade do Gelo Utilizado na Conservação de Pescado Fresco. *Arquivos do Instituto Biológico.*, v.76, n.3, 505-508;
- ✓ Germano, M. I. S. (2003) *Treinamento de Manipuladores de Alimentos: Factor de segurança alimentar e promoção da saúde.* São Paulo: Livraria Varela,
- ✓ Germano, P. M. L. (2008). *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos.* 3. ed. Barueri: Manole, v. 1. 986 pp;

- ✓ Godoy, B. P., Borrullc, C., Palàc, M., Caubetc, I., Bacha, P., Nuína, C e Espineta, L. (2003). Brote de gastroenteritis por água potável de suministro público. *Gaceta Sanitaria*, v.17, n.3, 204-209;
- ✓ Huss, H.H. Garantia da qualidade dos produtos da pesca. (1997). FAO Documento técnico sobre as pescas, nº 334. Roma:FAO, 176 p;
- ✓ INE. (2007). Estatística Distrital (Estatística do Distrito de Quelimane);
- ✓ INE. (2011). Estatística Distrital (Estatística do Distrito de Quelimane);
- ✓ Insalata, N. F. (1973). *Enteropathogenic E. coli. A new problem for the food, industry*. Food Technol. 27(5) : 5 6 - 5 8;
- ✓ Instituto Nacional de Inspeção do pescado. (2010) Procedimentos de aplicação dos requisitos hígiosanitários, 1ª Edição 2-5 pp;
- ✓ Jay, J. M. (2005). Microbiologia de alimentos. Artmed., 347-361;
- ✓ Lateef, A. Oloke, J. K. Gueguim, E. B. K. e Pacheco, E. (2006) *The Microbiological Quality of Ice Used to Cool Drinks and Foods in Ogbomoso Metropolis, Southwest, Nigéria*. *Journal of Food Safety*., v, 8, 39-43;
- ✓ Marinho, S. L. (2011). Critério Para Avaliação da Qualidade da Piramutaba (*Brachyplatystomavaillantii*) inteira estocada em gelo. Tese de Doutorado. Universidade Federal Fluminense, 28-29pp;
- ✓ Mendes, S. L. A. (2009). Qualidade Microbiológica do Gelo Para Consumo Em Bebidas. Um estudo nos estabelecimentos das zonas balneárias do Porto. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar;
- ✓ Moreno, I., Vialta, A., Lerayer, A. L. S., Salva, T. J. G., Vandender, A. G. F., Machado, R. C. (1999). Qualidade microbiológica dos leites pasteurizados produzidos no Estado de São Paulo. *Indústria de Laticínios*. n.13, 56-61;
- ✓ Muratori, M. C. S., Couto Filho, C. C. C., Araripe, M. N. B. A., Lopes, J. B., Costa, A. P. R. (2007). *Escherichiacolie Staphylococcus aureusem Manipuladores de Piscicultura*. *Revista Científica de Produção Animal*., Teresina, v. 09, n.2, 120-126;
- ✓ Nascimento, E. F., Molica, E. M e Moraes, J. S. (2000) Hortaliças Minimamente Processadas (Mercado e Produção). 1ª Edição. Brasília: EMATER-DF;
- ✓ Nichols, G., Gillespie, I., Louvois, J. (2000). *The microbiological quality of ice used to cool drinks and ready-to-eat food from retail and catering premises in the United Kingdom*. *Journal of Food Protection*, v.63, n.1,78-82;

- ✓ Oetterer, M. (2010). Proteínas do pescado - processamento com intervenção protéica. In: Oetterer, M., Regitano D'Arce, M.A., Spoto, M.H.F. *Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Barueri: 99-134.
- ✓ Ogawa, M., Maia, E. L. (1999). Manual de Pesca. Ciência e tecnologia do pescado. São Paulo. 3-5pp;
- ✓ Oliveira, D. T.; Moreira, A.; Urnau, L.; Noskoski, L.; Cereser, N. D. (2012). Psicrotóxicos na indústria de laticínios. XV Amostra de Iniciação Científica. UNICRUZ;
- ✓ Pimentel, L. P. S., Panetta, J. C. (2003). Condições higiênicas do gelo utilizado na conservação de pescado comercializado em supermercados na Grande São Paulo. *Revista Higiene Alimentar*, v. 17, n. 106, 64-71;
- ✓ Pires, V. P. (2006). Tecnologia do pescado. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto. 44 pp.
- ✓ Quinn, P. J.; Markey, B.K.; Carter, M. E.; Donnelly, W.J.; Leonard F.C. (2005). Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: Artmed, 55-59pp;
- ✓ Rio, D. P. A. (2004). Manual de boas práticas de fabricação em indústria de gelo. Tese de Licenciatura. Universidade de Brasília, Brasil;
- ✓ Serrano, N. F. G e Souza, C.P. (2008) Incidência de Coliformes, *Staphylococcus* coagulase positivo e *Pseudomonas spp.* em gelo produzido e comercializado na cidade de São Carlos – SP, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. 23 pp;
- ✓ Silva, G. D. (2009) Análise Microbiológica do Gelo em estabelecimentos de alimentação das Universidades Federais de Pernambuco. São Paulo. 376 pp;
- ✓ Silva, M. C. (2012). Avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema Sim Plate. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo;
- ✓ Scherer, R. Daniel., P. A. Augusti, R. P., Lazzari, R., Lima, L. R., Fries, M. L. L., Neto, R. J. e Emanuelli, T. (2004). Efeito do Gelo Clorado Sobre Parametros Quimicos e Microbiologicos da Carne de Carpa Capim (*Ctenopharyngodonidella*). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 24 (4): 680-684;
- ✓ Vieira, R. H. S. F. e Saker-Sampaio, S. (2004). Emprego de gelo nos barcos. *In: Vieira, R. H. S.* (editor). *F. Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática*. São Paulo: Varela. pp 37-39.

7. Anexos

Tabela 5. Materiais, meios de cultura, reagentes e equipamentos usados na pesquisa. (Fonte: Dados da pesquisa, 2017).

| | |
|-------------------------------------|---|
| Material | Colman isotérmica, Plástico de colheita de amostra, Luvas, Esferográfica, Bloco de notas, Frascos de 500mL, Colheres e Pratos descartáveis <i>Erlemayer</i> (200-1000 mL), Pipetas (5, 10, 15 e 25 ml), Placas de Petri (60 e 90 mm), Membrana filtrante de 0,45µm, Alça de platina Tubos de ensaio e de <i>Durham</i> , Alça <i>Drigalski</i> , Agitador magnético, Pipetas Pasteur, Bolsas stomacher, Bico de bunsen, Mascara, Bata, Provetas (500, 1000mL) e Suportes de tubos |
| Equipamentos | Geleiras ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$), Congelador ($-18 \pm 5^{\circ}\text{C}$) Incubadoras ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $44 \pm 1^{\circ}\text{C}$), Banho-maria ($45 \pm 1^{\circ}\text{C}$), Estufa, Micropipetas, Contador de colónias, |
| Meios de cultura e Reagentes | <i>M-Endo Agar Less</i> , Lauril sulfato <i>Broth</i> , <i>tryptonewater</i> , <i>SlanetzandBartley</i> , <i>Yeastextractagar</i> , Águapeptonada, Bile-aesculin-azidaagar, água peptonada a 1% tamponada, caldo Rappaport-Vassiliadis, Plasma de Coelho, <i>kovac's</i> (R), Álcool a 70% (D) |

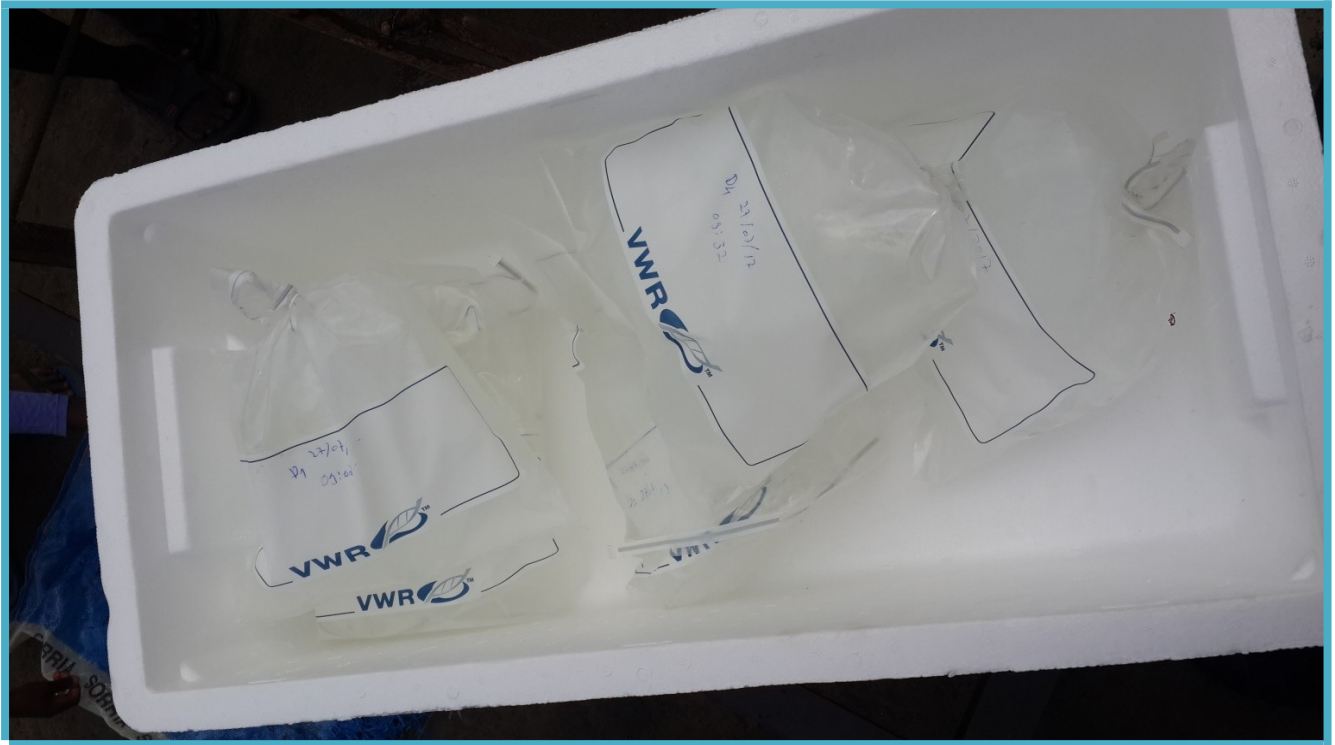


Figura 7. Colecta de amostras. (Fonte: Dados de pesquisa, 2017).



Figura 8. Fragmentação do gelo com recurso a ferro e faca. (Fonte: Dados de pesquisa, 2017).