



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

Pesquisa de *Listeria* sp. na linha de beneficiamento de camarão cinza

ANA ELIZABETH OLIVEIRA

Recife
2014

ANA ELIZABETH OLIVEIRA

Pesquisa de *Listeria* sp. na linha de beneficiamento de camarão cinza

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Celiane Gomes Maia da Silva

CO-ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Andrea Paiva Botelho Lapenda de Moura

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Recife

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

Pesquisa de *Listeria* sp. na linha de beneficiamento de camarão cinza

Por Ana Elizabeth Oliveira

Esta dissertação foi julgada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em __/__/__ pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos em sua forma final.

Banca Examinadora:

Profa Dra. Andrea Paiva Botelho Lapenda de Moura
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

Profa Dra. Andrea Christianne Gomes Barretto
Coordenação do curso de Alimentação Escolar DEAD - IFPE

Profa Dra. Samara Alvachian Cardoso Andrade
Departamento de Engenharia Química - UFPE

DEDICATÓRIA

**Dedico a conclusão de mais uma etapa a Deus, à família e aos amigos. Por tudo.
Sempre.**

AGRADECIMENTOS

A todos que fazem o Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de crescimento profissional e à CAPES pelo apoio financeiro da bolsa de estudos;

Ao LACEN-PE pela disponibilização de equipamento para análises;

À orientadora Profa Dra Celiane Gomes Maia da Silva e co-orientadora Profa. Dra. Andrea Paiva Botelho Lapenda de Moura pela companhia constante na jornada, diretrizes, apoio e compreensão;

Às componentes da banca de avaliação pela contribuição e participação num momento tão importante – Profa. Dra. Andrea Christianne Gomes Barretto e Profa. Dra. Samara Alvachian Cardoso Andrade

Às colegas de classe por todo o convívio, ajuda, descontração e aprendizado;

Às amigas do mestrado - Dessa, Elô e Mi - que fizeram as dificuldades, no mínimo, mais divertidas;

À Médica Veterinária Ana Magna de Carvalho Almeida Lins pela contribuição, apoio e amizade;

À técnica do Laboratório de Inspeção de Carne e Saúde Pública, Goretti Varejão pela ajuda, aprendizado e amizade;

À querida Médica Veterinária, Mariana por toda ajuda, atenção e disponibilidade;

À amiga Giselle Ramos pela amizade e apoio sempre!!

A Sílvia e Érika pela ajuda sem par, pela força e amizade;

A todos que não estão citados nominalmente aqui, mas também contribuíram para a finalização de mais essa etapa, fazendo parte de momentos importantes;

Às minhas amigas de todas as horas Anny, Carol e Vero pela amizade linda desde sempre pra sempre;

À minha filhota Jolie por todas as balançadas de cauda que me fazem esquecer das dificuldades e lembrar da alegria das coisas simples da vida;

À minha família linda - Tias Eva, Rosa, Fátima, Lúcia, Célia; Primos Ju, Richard e João e os “pequeninos” Igor, João e Pedro que alegram nossos corações - que mantêm na fé e na trilha do bem, que me apoia tanto, me dá tanto orgulho, esperança e conforto;

Em especial, ao meu tio-pai-padrinho que me deixa saudades e me dá forças do andar superior;

Ao meu marido lindo que há dez anos me acompanha e me completa, por toda paciência, amor e companheirismo;

Quase por último, mas mais que importante, minha mãezinha que me guia, me dá oportunidade de sentir o mais puro dos sentimentos; pela amizade, companheirismo, exemplo, dedicação, cuidado, alegrias, conversas, amor, amor e muito amor. Te amo, mainha. Sem você, nada seria possível.

À Deus que é meu guia, minha força, meu centro, meu porto, minha verdade e minha luz. Que continue sob a sua graça.

MUITO OBRIGADA!!!

RESUMO

O pescado tem papel importante no mercado alimentício do Brasil, especialmente no Nordeste. A segurança microbiológica desse tipo de alimento deve ser verificada, garantindo ao consumidor final um produto de qualidade e seguro à sua saúde. *Listeria monocytogenes* é um patógeno alimentar de alto risco, envolvido em grande número de surtos de doenças transmitidas por alimentos. Esse microrganismo não tem, porém, um limite estabelecido pela legislação vigente para os produtos do mar, o que muitas vezes faz com que sua presença não seja investigada nos controles de qualidade industriais. Tendo em vista essas informações, esse estudo teve como objetivo pesquisar *Listeria monocytogenes* em linha de produção de camarão-cinza (*Litopenaeus vannamei*) em entreposto de pescado no município de Recife, Pernambuco. A avaliação das condições higiênico-sanitárias do entreposto de pescado em estudo foi realizada com base na lista de verificação constante no Anexo II da RDC 275/2002 da ANVISA. Foram coletadas 39, incluindo amostras de camarão congelado e *swabs* de utensílios, superfícies e mãos dos manipuladores para pesquisa de *Listeria* sp.. A metodologia utilizada foi a oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Posteriormente, foi feita a identificação das culturas através do equipamento VITEK 2® (*Biomérieux*). De acordo com o preenchimento da lista de verificação, o entreposto foi classificado no Grupo 1 (76% a 100% de atendimento aos itens), com 85% de adequação para os itens checados. Uma das amostras de *swab* mostrou-se positiva para presença de *Listeria innocua*. Outros oito tipos de microrganismos foram identificados nas amostras analisadas, sugerindo um risco de contaminação dos produtos e ressaltando a importância de um controle de qualidade permanente.

ABSTRACT

Seafood products have an important role in the food market in Brazil, especially in the Northeast. The microbiological safety of this type of food must be checked, ensuring to the ultimate consumer a quality product and safe to his health. *Listeria monocytogenes* is a high risk food pathogen involved in a large number of outbreaks of foodborne illness. This microorganism doesn't have, however, a limit set by current legislation for seafood, which often makes its presence is not investigated in industrial quality control. Given these informations, this study aimed to search *Listeria monocytogenes* in production line of gray shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in a storage of fish in the city of Recife, Pernambuco. Evaluation of the hygienic-sanitary conditions of storage of fish in study was performed based on checklist contained in Annex II of the RDC 275/2002 of ANVISA. 39 samples, including frozen shrimp samples and utensil swabs, surfaces and hands of food handlers were collected for research of *Listeria* sp. The methodology used was the official of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Subsequently, the identification of the cultures was taken through the VITEK®2 equipment (Biomérieux). According to filling of the checklist, the industry was classified in Group 1 (76 % to 100% compliance with the items), with 85 % of the adequation to the checked items. One of the swab samples was positive for *Listeria innocua*. Eight other types of microorganisms were identified in the analyzed samples, suggesting a risk of product contamination and stressing the importance of a permanent quality control.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Segurança Alimentar	14
2.2 Panorama atual do pescado no Brasil.....	16
2.3 Qualidade do Pescado.....	17
2.4 <i>Listeria</i> sp.	21
2.5 Método automatizado de identificação microbiológica - VITEK®2.....	23
3. OBJETIVOS	26
3.1 Geral	26
3.2 Específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Local de estudo	28
4.2 Avaliação das condições higiênico-sanitárias.....	28
4.3 Aquisição de amostras de alimentos	28
4.4 Aquisição de amostras ambientais	Erro! Indicador não definido.
4.6 Análise das amostras	29
4.7 Local de análises	31
4.8 Estatística	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 Caracterização do local de estudo	33
5.2 Linha de produção de camarão-cinza.....	34
5.3 Avaliação Higiênico-Sanitária	35
5.4 Análises microbiológicas.....	37
5.5 Análise Estatística	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
8. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	50
ANEXOS.....	53
Anexo 1: Amostras e sua identificação	53
Anexo 2: Provas Bioquímicas realizadas pelo equipamento VITEK®2	53
2.1 Para amostras Gram-Positivas:	53
2.2 Para amostras Gram-Negativas:	55

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As más condições de manipulação, armazenamento e transporte do pescado fresco muito contribuem para a perda da qualidade e mesmo deterioração do pescado; além disso, as práticas tradicionais de passagem do pescado fresco através de um ou mais intermediários, em sua viagem do pescador ao consumidor final, também contribui decisivamente para a perda da qualidade e a deterioração do pescado fresco disponível ao consumidor nas feiras livres, mercados, peixarias e supermercados do país, sendo a indústria também prejudicada pelo recebimento de matéria prima de qualidade inferior a desejável. (SANTOS, 2006). A alta perecibilidade desse produto pode ser explicada devido à ação de enzimas autolíticas, ou seja, do próprio pescado, e pela relação menos ácida de sua carne, que favorece o crescimento microbiano (NEIVA, 2007). Os microrganismos de uma forma geral estão amplamente distribuídos na natureza e, especialmente, *Listeria monocytogenes* possui a habilidade de sobreviver em condições adversas, resistência a diversos antibióticos e capacidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração, o que a torna um importante patógeno de origem alimentar (LAPENDA, 2010).

De acordo com a literatura 32% dos casos esporádicos de listeriose são atribuídos ao consumo de alimentos contaminados e entre os principais itens de risco estão os produtos cárneos (peixes, aves e mamíferos em geral) e seus derivados (queijos, leite, sorvetes) (DEL PILAR CRESPO *et al.*, 1999).

A higienização deficiente em equipamentos e utensílios têm sido responsável, isoladamente ou associada a outros fatores, por surtos de doenças de origem alimentar ou por alterações de alimentos processados (ANDRADE e MACÊDO, 1996). Há relatos de que utensílios e equipamentos contaminados participam de aproximadamente 16% dos surtos (FREITAS, 1995).

A dificuldade em eliminar esse microrganismo das indústrias é potencializada pelas condições de umidade, temperatura e presença de matéria orgânica nas plantas de processamento, que aliadas à habilidade do patógeno em formar biofilmes, podem desencadear a colonização de superfícies de equipamentos e utensílios (SILVA *et al.*, 2003).

Peixes e camarões capturados de águas contaminadas com *L. monocytogenes* podem carrear esse patógeno. Eles podem também ser contaminados durante o transporte e no ambiente de comércio (WAN NORHANA *et al.*, 2010). Em indústrias de processamento de pescado, *L. monocytogenes* advinda das matérias-primas pode

contaminar os produtos finais. Por outro lado, é sabido que cepas persistentes de *L. monocytogenes* no ambiente também podem ser a fonte de contaminação dos produtos finais (HUSS et al., 2000). O patógeno pode entrar na planta de processamento através de água contaminada, utensílios, pessoal e matérias-primas, daí contaminando a linha de processamento e os produtos finais (JOHANSSON et al., 1999).

Conhecendo-se a ampla distribuição da *L. monocytogenes* na natureza, sua patogenicidade, capacidade de sobreviver em alimentos refrigerados e resistência a tratamentos térmicos são necessárias para determinar a ocorrência desse microrganismo em utensílios e equipamentos, e a partir daí, estabelecer medidas eficazes de controle da contaminação.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Segurança Alimentar

A Organização Pan-americana da Saúde (OPAS, 2006) define segurança dos alimentos como sendo garantia de que os alimentos não causem danos ao consumidor, quando preparados e ou consumidos de acordo com o uso a que se destinam e ressalta que as possíveis fontes de contaminação do ambiente devem ser consideradas. Em particular, a produção primária dos alimentos não deve ocorrer em áreas onde a presença de substâncias potencialmente perigosas pode resultar em um nível inaceitável de tais substâncias no alimento.

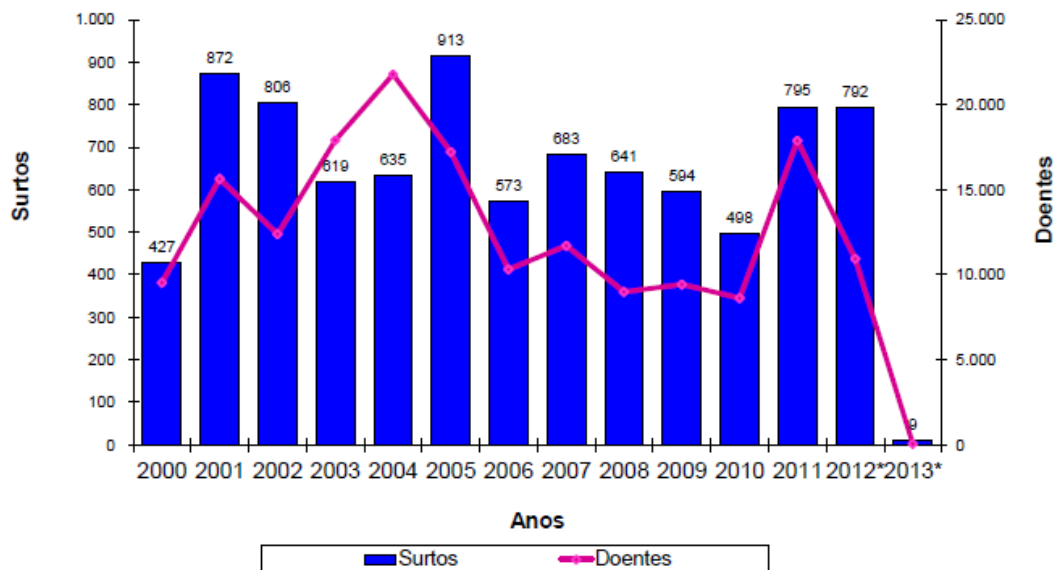
Segundo a Food and Drug Administration - FDA (2011), a carga de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) é considerável. Todos os anos, uma de seis pessoas nos Estados Unidos - numa população de 48 milhões de pessoas - sofre de doenças transmitidas por alimentos, mais de cem mil são hospitalizadas, e milhares morrem. A FDA cita ainda algumas medidas importantes de segurança alimentar, como controle preventivo, inspeção e parcerias reforçadas.

De acordo com a World Health Organization (WHO, 2012), alimentos contaminados provocam muitas doenças, agudas e crônicas, que vão desde doenças diarréicas até várias formas de câncer. Essa entidade estima que doenças de origem alimentar e hídrica juntas matam cerca de 2,2 milhões de pessoas anualmente, sendo cerca de 1,9 milhões de crianças desse total.

A mesma fonte afirma ainda que doenças transmitidas por alimentos e as ameaças à segurança alimentar constituem um problema crescente de saúde pública, e é sua missão ajudar os Estados-Membros a reforçarem os seus programas para melhorar a segurança dos alimentos por todo o caminho da produção até o consumo final.

No Brasil, o número oficial de surtos por doenças de origem alimentar parece pequeno muitas vezes, o que pode estar relacionado com a falta de notificação, e não com a não-ocorrência de doenças alimentares. É possível observar na Figura 1 dados relativos a essas situações no país.

Figura 1. Número de surtos e doentes por DTA no Brasil de 2000 a 2013*.



Fonte: Sinan Net/SVS/MS *Dados sujeitos a alteração



Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS, 2013), 38,9% desses surtos ocorreram na Região Sul contra apenas 3,5% da Região Norte, dados que chamam atenção por sua diferença extrema e que trazem mais uma vez a dúvida da real situação nacional, se casos notificados corresponderiam ou não à ocorrência geral de casos de DTA. Essa mesma fonte aponta que os locais de maior ocorrência dos surtos são as residências, restaurantes e de fonte ignorada e ressalta os tipos de alimentos mais envolvidos nesses surtos, liderando esse ranking os seguintes tipos em sequência: alimentos mistos, alimentos a base de ovos, água, doces e sobremesas e leite e derivados, seguidos de várias outras classes. Os agentes etiológicos envolvidos nos surtos são mostrados na figura 2.

Figura 2. Agentes etiológicos associados aos surtos de DTA no Brasil de 200 a 2013*.

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012*	2013*	Total	%
<i>Salmonella</i> spp.	140	208	218	139	155	161	111	119	108	77	35	28	28	0	1.525	39,39
<i>S. aureus</i>	35	96	89	51	60	103	46	50	53	65	41	38	36	0	763	19,71
<i>B. cereus</i>	6	23	29	21	24	34	40	19	29	25	15	22	8	0	295	7,62
<i>E. coli</i>	14	44	33	31	41	65	43	20	27	38	28	50	46	0	480	12,40
<i>Campylobacter</i> spp.	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,08
<i>C. perfringens</i>	9	14	19	8	21	30	18	12	11	12	19	15	10	0	198	5,11
<i>C. botulinum</i>	0	1	1	0	0	1	6	0	0	1	1	0	0	0	11	0,28
<i>Shigella</i> spp.	7	22	17	10	7	9	1	1	0	4	1	4	6	0	89	2,30
<i>V. cholerae</i> O1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,05
<i>V. parahaemolyticus</i>	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	4	0,10
<i>Cryptosporidium</i> spp.	0	6	1	4	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	13	0,34
Rotavírus	2	38	24	27	38	33	2	4	4	1	3	12	4	0	192	4,96
Norovírus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	9	8	0	24	0,62
Hepatite A	46	71	38	19	7	37	4	5	2	1	3	1	2	0	236	6,10
<i>Enterobacter</i> spp.	0	1	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	1	0	6	0,15
<i>T. gondii</i>	0	1	0	0	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	5	0,13
Giardia	1	4	3	2	1	1	0	2	6	0	0	1	1	0	22	0,57
<i>T. cruzi</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2	0	0	4	0,10
Inconsistência	5	12	15	15	4	7	2	15	8	15	8	6	21	0	133	1,52
Inconclusivo	3	22	12	8	7	26	11	18	116	77	54	194	143	0	691	7,90
Ignorado	155	303	300	265	258	399	275	413	270	280	272	383	468	9	4.050	46,31
Total de agentes identificados	262	528	472	316	358	479	272	232	240	226	153	184	150	0	3.872	44,27
Total geral	425	865	799	604	627	911	560	678	634	598	487	767	782	9	8.746	100,00

Fonte: Sinan Net/SVS/MS *Dados sujeitos a alteração

Inconsistência: Informações não condizentes com o campo de preenchimento
Inconclusivo: Quando o campo apresenta informações vagas

2.2 Panorama atual do pescado no Brasil

De acordo com o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2013), os brasileiros hoje consomem muito mais pescado do que antigamente, para surpresa até de especialistas das áreas de alimentação e abastecimento. Segundo dados desta fonte, a média por habitante ano no País alcançou 11,17 quilos em 2011, nada menos do que 14,5% a mais do que em relação ao ano anterior e entre 2009 e 2010 o ritmo de crescimento da demanda foi de 7,9%; em dois anos (2010 e 2011) o crescimento da demanda por peixes e frutos do mar aumentou em média 23,7%, levando a acreditar que atualmente os brasileiros já devem consumir pescado na média mínima recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), de 12 quilos por habitante/ano.

O consumo per capita de camarão no Brasil cresceu de 0,06kg em 1999 para 0,402 kg em 2010, o que representa aumento de 570,0% ; em 2010, houve crescimento de 15 mil ton (23,08%) em relação a 2009. Ximenes et al. (2011) afirma que a maior parte do camarão consumido internamente é absorvida pelo “mercado institucional”, composto por bares, restaurantes e hotéis, sendo abastecido principalmente pelas

indústrias de pescada; a produção dos pequenos e médios empreendimentos é comercializada para atravessadores que vendem o produto nos grandes centros urbanos do Nordeste, sendo o transporte e o acondicionamento, geralmente, inadequados. No Nordeste os principais produtores de camarão são Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Bahia que geraram cerca de 4000 empregos formais em 2010 envolvidos com a carcinicultura, como é possível observar na tabela abaixo:

Tabela 1. Evolução da geração de empregos formais na carcinicultura no período de 2006 a 2010 nos principais produtores do Nordeste.

Estado	2006	2007	2008	2009	2010
Ceará	1.462	835	902	1.039	1.482
Rio Grande do Norte	2.171	1.809	1.855	1.581	1.380
Bahia	1.269	948	865	797	848
Pernambuco	530	384	426	431	559
Piauí	379	223	248	236	147
Total	5.811	4.199	4.296	4.089	4.416

Fonte: RAIS - Decreto nº 76.900 / 1975 – CGET / DES / SPPE / TEM (Elaboração CIEST / ETENE / BNB). Retirado de Ximenes et al. (2011) – Informe Rural ETENE.

2.3 Qualidade do Pescado

A qualidade de um produto pode ser observada como um conjunto de fatores que trazem sob diversos pontos de vista, valor agregado a produto. Assim, podemos citar como aspectos da qualidade, higiene da produção, composição química e nutricional do alimento, características do ambiente de cultivo, tratamento tecnológico pelo qual passa, saúde dos animais (para produtos animais, como no caso do camarão cinza) e expectativas e necessidades do público consumidor.

Apesar de conter nutrientes essenciais para alimentação humana, o pescado também pode veicular uma gama enorme de microrganismos patogênicos, a maior parte deles fruto da contaminação do ambiente ou pelo manuseio inapropriado. Dentre os agentes transmitidos por pescado encontram-se os endoparasitos, as biotoxinas, os poluentes químicos e metais tóxicos (FOGAÇA, 2009).

De acordo com a FAO (2012), a qualidade de um alimento como o camarão pode ser definida por três fatores principais:

- ✓ Características sensoriais (aparência, carapaça/cabeça e odor, sabor e cor)
- ✓ Presença/ausência de resíduos químicos (antibióticos, pesticida e outros)
- ✓ Nível de contaminação microbiológica

De acordo com Huss (1997) em documento técnico da FAO, a verdadeira incidência das doenças transmitidas por produtos alimentares não é conhecida e há muitas razões para este fato, como a não-obrigatoriedade de relatar às autoridades de saúde pública as doenças provocadas pela ingestão de alimentos, a falta de consciência epidemiológica dos médicos e pacientes e a indisponibilidade dos prováveis alimentos responsáveis pelas doenças para análise. A mesma fonte destaca que as bactérias patogênicas presentes no pescado podem se divididas em dois grupos como apresenta o Quadro 1:

Quadro 1. Bactérias patogênicas presentes no pescado.

		Modo de atuação		Estabilidade térmica da toxina	Dose infecciosa mínima
		Infecção	Toxina pré-formada		
Bactérias indígenas (Grupo 1)	<i>Clostridium botulinum</i>		+	baixa	-
	<i>Vibrio</i> sp.	+			Alta
	<i>V. cholerae</i>				-
	<i>V. parahaemolyticus</i>				(>10 ⁶ /g)
	outros vibrios ¹				-
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	+			Não conhecida
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	+			Não conhecida
	<i>Listeria monocytogenes</i>	+			Não conhecida/

					Variável
Bactérias não indígenas (Grupo 2)	<i>Salmonella</i> sp.	+			desde 10^2
					até >math>10^6</math>
	<i>Shigella</i>	+			10^1-10^2
	<i>E. coli</i>	+			10^1-10^3 ²
	<i>Staphylococcus aureus</i>		+	alta	-

1) Outros vibrios são: *V. vulnificus*, *V. hollisae*, *V. furnsii*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*.

2) Para a estirpe 0157:H7 produtora de verotoxina.

Fonte: Huss, 1997 (Documentos Técnicos – FAO).

No Brasil, a RDC 12/2001 (BRASIL, 2001) não especifica padrões para *Listeria monocytogenes* em pescado, mas determina que para esse tipo de alimento deve-se seguir os seguintes limites (Quadro 2):

Quadro 2. Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos - Pescados e Produtos de Pesca.

Tipo de alimento	Microrganismo	Tolerância para amostra indicativa
Pescado, ovas de peixes, crustáceos e moluscos cefalópodes "in natura", resfriados ou congelados não consumido cru;	Estafilococos coagulase positiva/g	10^3
Pescado defumado, moluscos e crustáceos, refrigerados ou congelados	Coliformes a 45°C/g <i>Salmonella</i> sp./25g Estafilococos coagulase positiva/g	10^2 Ausente 5×10^2

Fonte: BRASIL, 2001.

Em camarões, pode-se destacar a contaminação por sulfito / metabissulfito, substância em pó utilizada como aditivo para efeito conservante contra o aparecimento

da melanose, que pode provocar alergias e até morte por intoxicação grave (MOURA et al., 2008).

A bioacumulação de metais pesados também é um problema que pode gerar risco ao consumo de pescado. Segundo Pinto et al (2013), atualmente muitos casos de morbidade e mortalidade, além de casos de câncer e de intoxicações, tem sido relacionados a fatores ambientais, tais como a exposição à substâncias químicas, como metais pesados por exemplo cujo efeito no organismo é influenciado por aspectos biológicos (espécie, idade, sexo, etc.), tipo de alimento, quantidade ingerida, ambiente e método de preparação culinária. Segundo esses autores as intoxicações por metais pesados, que ocorrem frequentemente, são causadas por cádmio, cobre, chumbo, cromo, zinco, entre outros.

O ambiente de processamento do pescado também pode representar risco de contaminação dos produtos. Satoko et al. (2010) afirma que plantas de processamento de alimentos tem sido a maior fonte de contaminação por *L. monocytogenes* em muitos tipos de alimentos, incluindo “pescados prontos para consumo”; Guedes et al. (2011) avaliou um entreposto de pescado em Belém do Pará e do total de amostras analisadas foi possível o isolamento de 21 bactérias pertencentes aos gêneros *Klebsiella* (33,3%), *Proteus* (23,9%), *Micrococcus* (14,3%), *Escherichia* (9,5%), *Staphylococcus* (9,5%) e *Corynebacterium* (9,5%) e oito fungos dos gêneros *Candida* (50%), *Fusarium* (25%) e *Rhizopus* (25%).

2.5 Camarão cinza (*Litopenaeus vannamei*)

De acordo com Santana e Pereira (2002), o camarão cinza está taxonomicamente classificado desta forma:

Filo: Crustacea (Pennant, 1777)

Classe: Malacostraca (Latreille, 1806)

Subclasse: Eumalacostraca (Grobber, 1892)

Superordem: Eucarida (Calman, 1904)

Ordem: Decapoda (Latreille)

Subordem: Dendrobranchiata (Bate, 1888)

Superfamília: Penaeoidea (Rafinesque, 1815)

Família: Penaeidae (Rafinesque, 1815)

Gênero: *Litopenaeus*

Espécie: *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

O camarão *L. vannamei* é uma espécie nativa da costa sul americana do Oceano Pacífico, sendo cultivado em todos os países produtores de camarão do mundo ocidental (MAGALHÃES, 2004). Apresenta em geral taxa de crescimento uniforme, fácil adaptabilidade a diferentes condições físico-químicas do meio ambiente, como por exemplo salinidade e temperatura (LOTZ, 1997). O ciclo de vida desse camarão compreende as fases de: ovo, náuplios (possuem 5 subestágios), protozéria (possuem 3 subestágios), pós-larvas e animais adultos; todas as fases se alimentam de fitoplâncton, exceto a partir das pós-larvas que passam a ingerir detritos bentônicos, vermes, moluscos bivalves e crustáceos (FAO, 2012).

Essa mesma entidade identifica as principais enfermidades que acometem o *Litopenaeus vannamei*: vírus da mancha branca, doença da cauda vermelha, síndrome da deformidade de Runt, doença da turbidez branca e vibriose (por *Vibrio* spp.).

2.4 *Listeria* sp.

Bactérias do gênero *Listeria* são gram positivas, não esporuladas que possuem hastes curtas (0.4–0.5 μm), presentes em todo tipo de ambiente. São móveis por meio de flagelos que dão a motilidade em forma de saltos (SEELIGER e JONES, 1986). São anaeróbicas facultativas com características psicrotróficas e mesofílicas, sendo o gênero composto por seis espécies: *L. monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, e a primeira citada é mundialmente reconhecida como o principal patógeno humano do gênero (WAN NORHANA et al, 2010).

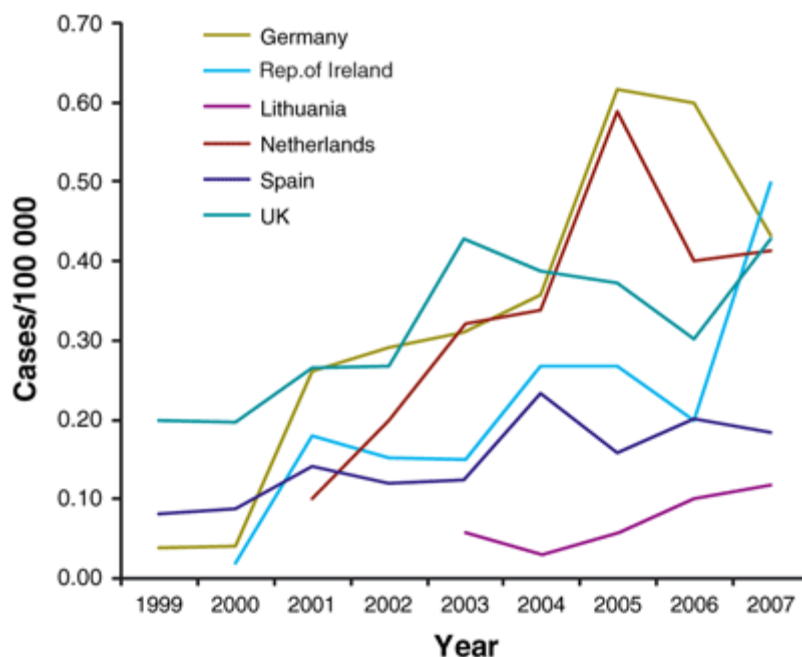
Em relação às características bioquímicas, é catalase positiva, oxidase negativa, móvel a 20°C, algumas espécies são β hemolíticas em Agar sangue (*L. monocytogenes*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii*) e apresenta crescimento na faixa de 2,5°C a 44°C, suportando repetidos congelamentos e descongelamentos (JAY, 2005).

A listeriose animal e humana foi reconhecida como infecção causada por bactéria na década de 1920, e subsequentemente nomeou-se a espécie *Listeria monocytogenes*. (ROCOURT e BUCHRIESER, 2007). A partir de 1981, *L. monocytogenes* adquiriu reconhecimento como um importante agente patogênico de origem alimentar, quando a taxa de mortalidade dos surtos não parecia diminuir ao longo dos anos, embora o número de casos fosse pequeno quando comparado com as doenças associadas com a salmonelose e campilobacteriose (TODD e NOTERMAN, 2011).

A listeriose, causada em 98% dos casos pela *L. monocytogenes* possui sintomas como septicemia, meningite (ou meningoencefalite), encefalite, infecção cervical ou intra-uterina em gestantes, as quais podem provocar aborto (no segundo ou terceiro trimestre) ou nascimento prematuro, estando associada aos indivíduos com comprometimento imunológico, como gestantes e seus fetos, neonatos, idosos, indivíduos HIV positivos (JAY, 2005).

Nos últimos anos, um aumento na taxa de casos de listeriose tem sido reportado em alguns países europeus; esse aumento reflete primariamente um aumento da taxa de listeriose na população maior de 65 anos e não tem correlação com geografia, gênero, etnia nem fatores sócio-econômicos (ALLERBERGER E WAGNER, 2010). A Figura 3 ilustra essa situação, mostrando a incidência de listeriose em alguns países europeus num período de oito anos. Um aumento na ocorrência da doença é visível, especialmente nos últimos anos do gráfico e os autores da pesquisa afirmam não haver nenhuma razão notável para esse fenômeno, exceto talvez, na Alemanha (Germany) onde a listeriose passou a ser uma doença notificável em 2001 (Denny; McLauchlin, 2008). Esses autores destacam que mudanças na vigilância de doenças alimentares e aumento da consciência de diagnóstico, podem ser causa do aumento dos números da listeriose nesses países.

Figura 3. Incidência de listeriose em seis países europeus de 1999 a 2007.



Fonte: Denny; McLauchlin, 2008

Sauders e Wiedmann (2007) concluem que há duas possíveis causas para os surtos ocorrerem: ingredientes crus contaminados por *L. monocytogenes* que entram em uma planta de processamento podem levar a altos níveis de contaminação em um ou mais lotes de alimentos; em outro cenário, erros na manutenção das instalações podem liberar fatores persistentes de contaminação dos alimentos periodicamente durante um longo período de tempo. Os níveis de contaminação por esses meios citados podem aumentar se o tempo e a temperatura durante o processamento ou armazenamento assim propiciarem. Infelizmente, a maioria das infecções por *L. monocytogenes* ocorrem sem uma ligação clara a um surto e são considerados "esporádicos" (VARMA et al., 2007).

O aumento do consumo de pratos da culinária japonesa, a base de alimentos crus também é um fator preocupa do ponto de vista da segurança alimentar, pois microrganismos como *Listeria* sp. podem sobreviver a baixas temperaturas e podem estar presentes nesses alimentos que não passam por tratamentos térmicos de calor pré-consumo. Satoko et al. (2005) analisaram 208 amostras de tipos de pescado crus e detectou 10 amostras positivas para *L. monocytogenes* através do kit de identificação mini-VIDAS LMO; Atassova et al. (2008) investigaram a qualidade microbiológica de 250 peças de sushi e verificaram que a prevalência de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foi maior nas amostras frescas, *Salmonella* foi encontrada em 4 amostras e *L. monocytogenes* em 3 exemplares.

2.5 Método automatizado de identificação microbiológica - VITEK®2

Vários sistemas comerciais de identificação bioquímica bacteriana estão disponíveis no mercado, mas o custo é elevado e para algumas bactérias, a identificação ainda é passível de melhorias (GHENGHESH et al., 2008).

O sistema VITEK®2 realiza identificação automatizada de microrganismos presentes em matérias-primas, ambientes de produção e produtos finais. A tecnologia do sistema permite a rápida identificação dentro de horas, ao invés dos longos dias dos métodos convencionais (CROWLEY et al., 2012). A verificação dos microrganismos é feita através do sistema de cartões de identificação para Gram-positivos e Gram-negativos, que são elementos de uso único com base em métodos bioquímicos estabelecidos e substratos recém-desenvolvidos medindo utilização de fontes de carbono, resistência e as atividades enzimáticas; além de conterem sempre um controle

negativo e poder ser realizado teste de susceptibilidade a antibióticos; a identificação do organismo testado é baseada nos dados e referências sobre o organismo e nas reações analisadas (*BIOMÉRIEUX*, 2004). Como parte do processo de identificação, o VITEK®2 as reações do teste com as reações esperadas para tipo de microrganismo. Um valor qualitativo referente ao percentual de probabilidade do resultado da identificação é calculado e registrado juntamente com o resultado final; esse valor reflete quão correlatas foram as reações ocorridas no teste e as esperadas para cada tipo de microrganismo (*BIOMÉRIEUX*, 2008). Esse método automatizado foi reconhecido e aprovado como oficial pela Association of Official Analytical Chemists – AOAC em 2011 para identificação de microrganismos Gram positivos e Gram-negativos (AOAC, 2012).

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Pesquisar *Listeria* sp. em linha de produção de camarão-cinza (*Litopenaeus vannamei*) em entreposto de pescado do município de Recife, Pernambuco.

3.2 Específicos

Realizar diagnóstico higiênico-sanitário do entreposto de pescado;

Avaliar amostras de camarão congelado quanto à presença de *Listeria* sp.;

Investigar em instalações, utensílios e manipuladores a presença de *Listeria* sp.;

Realizar identificação de microbiológica em equipamento automatizado.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de estudo

O estudo foi realizado num entreposto de pescado do município de Recife, Pernambuco. A empresa recebe camarões, lagostas peixes e mexilhões de diversas fazendas de cultivo e criatórios da região Nordeste e comercializa o pescado fresco, congelado ou beneficiado.

4.2 Avaliação das condições higiênico-sanitárias

A avaliação das condições higiênico-sanitárias foi realizada com base na lista de verificação constante no Anexo II da RDC 275 - Lista de verificação das boas práticas de fabricação em estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos (BRASIL, 2002).

4.3 Aquisição de amostras

As amostras de camarão congelado foram cedidas pelo proprietário do entreposto e coletadas em sua embalagem de comercialização. Foram adquiridos 500g de cada tipo de beneficiamento do camarão cinza - *Litopenaeus vannamei* - congelados (inteiro, sem cabeça, *tailon* e filé – Figura 4).

Figura 4. Filé de camarão na embalagem comercial, ilustrando o formato das amostragens de produto.



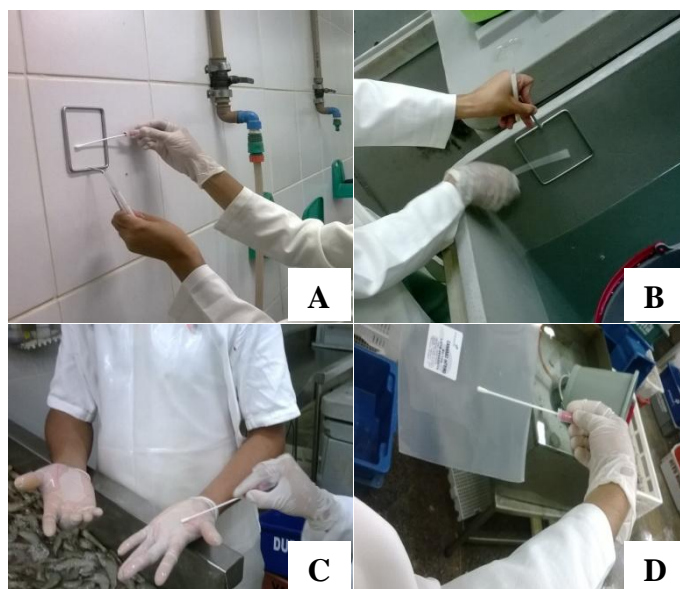
Foram coletadas também amostras ambientais, utilizando a técnica de esfregação de superfícies com *Quick Swabs 3MTM* de acordo com o preconizado pelo fabricante. Os *swabs* foram utilizados para amostrar utensílios no salão de beneficiamento, estrutura

física (paredes, portas, piso e teto) e mãos dos manipuladores (Anexo 1), com o auxílio de moldes estéreis de aço inox de 10cm², conforme a metodologia de Lakicevic et al. (2010). A utilização de cada um dos moldes foi determinada de acordo com a dimensão do ponto amostrado, e quando o formato não permitia a adequação dos mesmos, toda a superfície foi amostrada, incluindo-se nesse caso as mãos dos manipuladores.

A amostragem de utensílios e manipuladores foi determinada usando a técnica de amostragem aleatória simples, que consiste em escolher uma amostra de forma que todos os elementos pertencentes a um mesmo grupo tenham a mesma probabilidade de serem selecionados, obtendo-se uma amostra probabilística de um determinado número de elementos.

As amostras dos *Quick Swabs* foram mantidas sob-refrigeração e encaminhadas em caixa isotérmica contendo gelo reciclável para o laboratório, sendo processadas imediatamente; os camarões foram mantidos em temperatura de coleta até o momento das análises.

Figura 5. Coleta de *swabs*. **A e B.** Amostragem de parede e container de gelo (respectivamente) utilizando molde de inox; **C.** Amostragem de mão de manipulador com luva; **D.** Amostragem de embalagem.



4.4 Análise das amostras

Foi realizada análise microbiológica para pesquisa de *Listeria monocytogenes*. As amostras de camarões e *swabs* foram processadas seguindo a metodologia oficial do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2001), sendo

os swabs com sua porção manipulada eliminada conforme recomendado por Pinto et al. (2004). Foram feitas as etapas de enriquecimentos seletivos, semeadura em meio ágar Palcam, coloração de Gram, inoculação em ágar motilidade, teste de catalase e CAMP-teste. Todas as amostras (positivas e negativas para *Listeria* sp.) foram semeadas em ágar sangue (meio de cultura inespecífico) e seguiram para processamento no equipamento VITEK®2, através do uso de cartelas para identificação de bactérias gram-positivas (GP) e gram-negativas (GN).

Figura 6. Sequência dos primeiros passos da pesquisa de *Listeria* sp. **A)** Amostras de swab no caldo UVM; **B)** Amostras de camarão no caldo UVM; **C)** Caldo Fraser turvado; **D)** Semeadura em Agar Palcam; **E)** Prova da Motilidade.

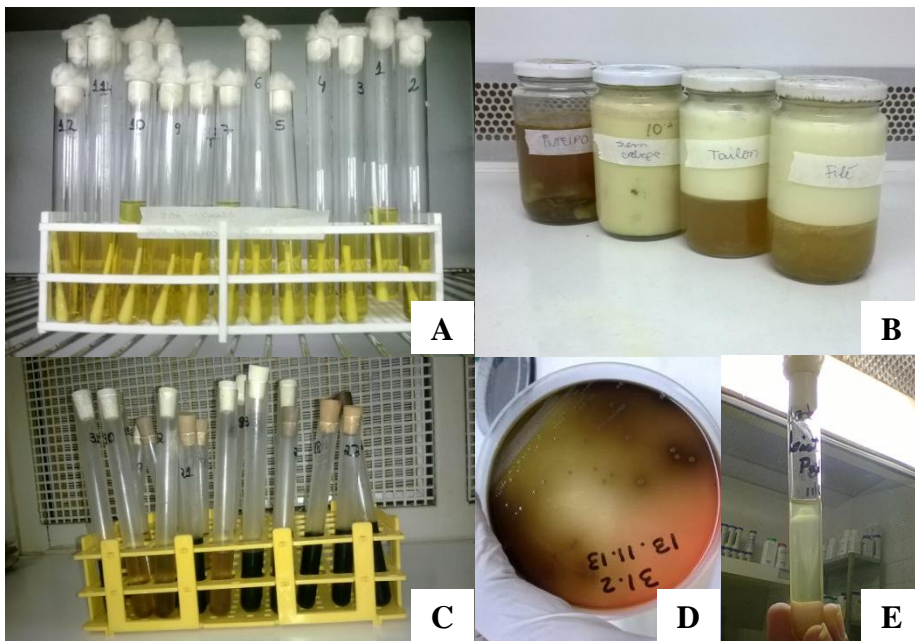


Figura 7. Equipamento VITEK®2



4.7 Local de análises

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Inspeção de Carne e Saúde Pública (LICASP) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFRPE e o processamento no equipamento VITEK®2 foi feita no Laboratório Central de Pernambuco (LACEN-PE).

4.8 Estatística

Os dados foram tabulados através da estatística descritiva.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do local de estudo

O entreposto de pescado estudado localiza-se na região metropolitana de Recife-PE e possui cerca de 50 funcionários. Os produtos beneficiados são obtidos de cerca de oito fornecedores fixos, além dos flutuantes, e são peixe, camarão, polvo, marisco, sururu, siri e carne de caranguejo. Apesar de trabalhar com diversos produtos diferentes, as linhas de produção não oferecem risco de contaminação cruzada, pois ocorrem em espaços e tempos diferentes. Os produtos elaborados na empresa são comercializados para redes de lanchonetes e restaurantes de áreas próximas que servem preparações com frutos do mar (pescado) como ingredientes.

O entreposto está em processo de retirada do SIE (Selo de Inspeção Estadual), possui uma Médica Veterinária como responsável técnica e seus funcionários estão em treinamento.

Algumas falhas na localização e organização logística de alguns equipamentos favorecem o aumento do risco de contaminação dos produtos nas linhas de produção. Por exemplo, a esteira de seleção e lavagem dos camarões está localizada após as mesas de manipulação, em frente à porta do túnel de congelamento; estaria melhor posicionada se estivesse na entrada no salão de beneficiamento, no início de toda a linha de produção, já que recebe produtos frescos e não selecionados.

Um ponto interessante é a utilização de alúmen de potássio na manipulação do camarão. Apesar de ser utilizado em diversas indústrias de pescado da região como “agente liberador da casca”, não há qualquer embasamento científico que justifique essa utilização, sendo o uso desse material referenciado na literatura principalmente como cicatrizante e em alguns estudos de solo como agente facilitador da precipitação de sólidos (CAVALCANTE et al., 2012; FRANCO et al., 2012).

O ponto referente à cadeia de frio é de extrema importância, visto que é ela que assegura a manutenção da temperatura de conservação do alimento. De acordo com Pinto; Neves (2010), com a aplicação de temperaturas reduzidas, consegue-se conservar alimentos não permitindo a sua deterioração, inibindo o desenvolvimento de microrganismos patogênicos, bem como retardando a evolução e concretização das reações enzimáticas e químicas, sendo, portanto, o método de conservação pelo frio bastante dispendioso, porém necessário. No caso do entreposto em questão, não há

gerador, o que não garante 100% da eficácia dos efeitos de uma cadeia de frio, podendo gerar risco de contaminação/deterioração dos produtos.

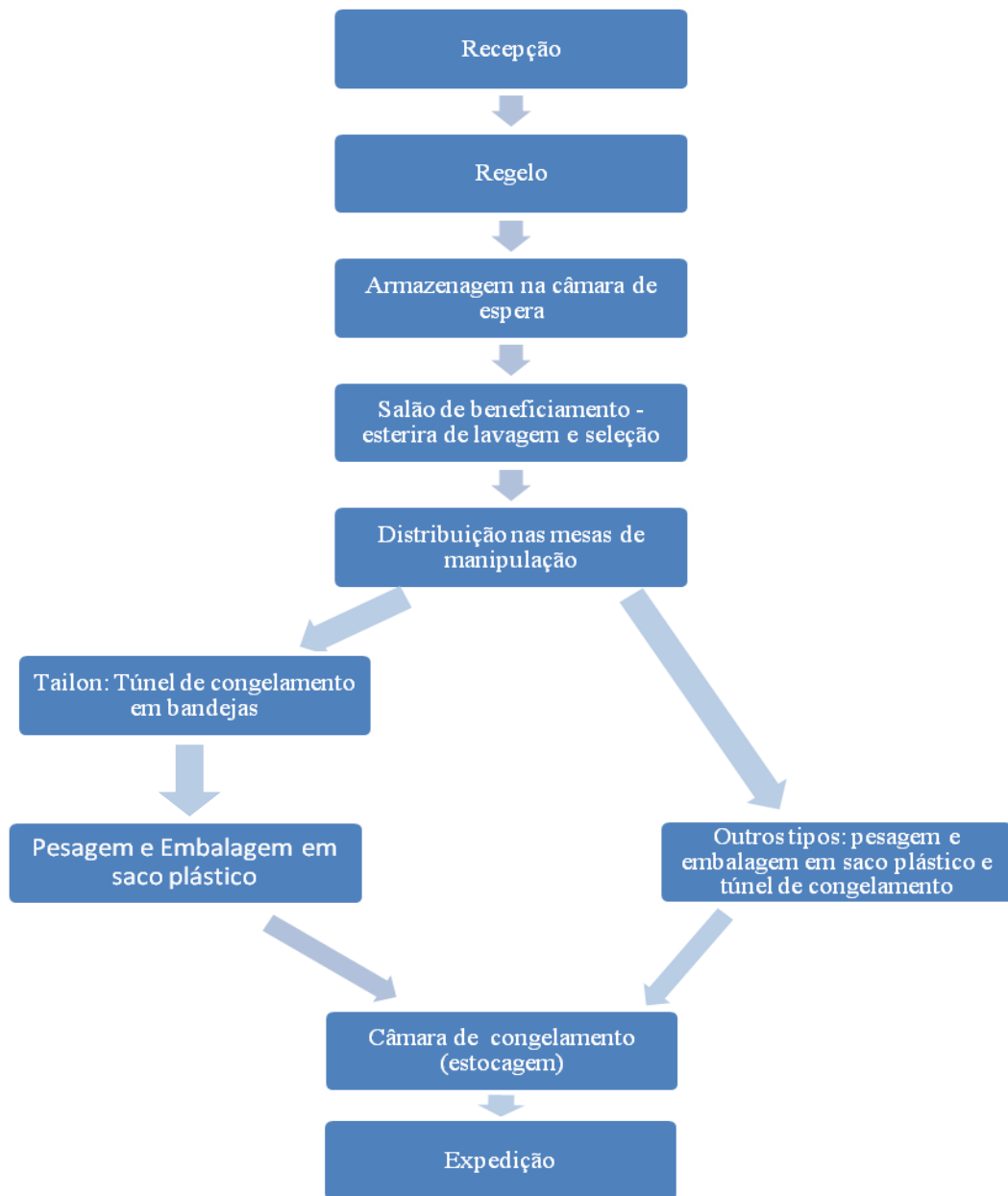
O controle microbiológico dos produtos e do ambiente não é realizado na indústria. Com a aquisição das amostras para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* nesse trabalho, esta etapa de monitoramento começou a ser realizada. Abati et al. (2012), ressaltam que a utilização de antimicrobianos nas formulações de sanitizantes e desinfetantes contribuem para a manutenção dos níveis de higienização e tais produtos, quando usados como parte de um programa de higiene e sanitização, alinhados com os princípios da análise de perigos e pontos críticos de controle, ajudam a manter os microrganismos patogênicos sob controle. Por isso, o monitoramento microbiológico periódico dos produtos, ambiente e manipuladores é importante, para verificar o nível de contaminação do ambiente geral de processamento, como também para avaliar a eficácia e adequação dos produtos de limpeza e sanitização utilizados.

5.2 Linha de produção de camarão-cinza

A linha de produção do camarão-cinza (*Litopenaeus vannamei*) tem por produtos finais: camarão inteiro, *tailon*, camarão sem cabeça e filé de camarão. Todos os produtos finais são comercializados congelados e em porções de no máximo 600g (o peso das porções é de acordo com o tipo do produto).

A linha de produção de camarão-cinza no entreposto de pescado estudado segue a sequência descrita na Figura 8.

Figura 8. Sequência da linha de beneficiamento do camarão cinza no entreposto de pescado estudado.



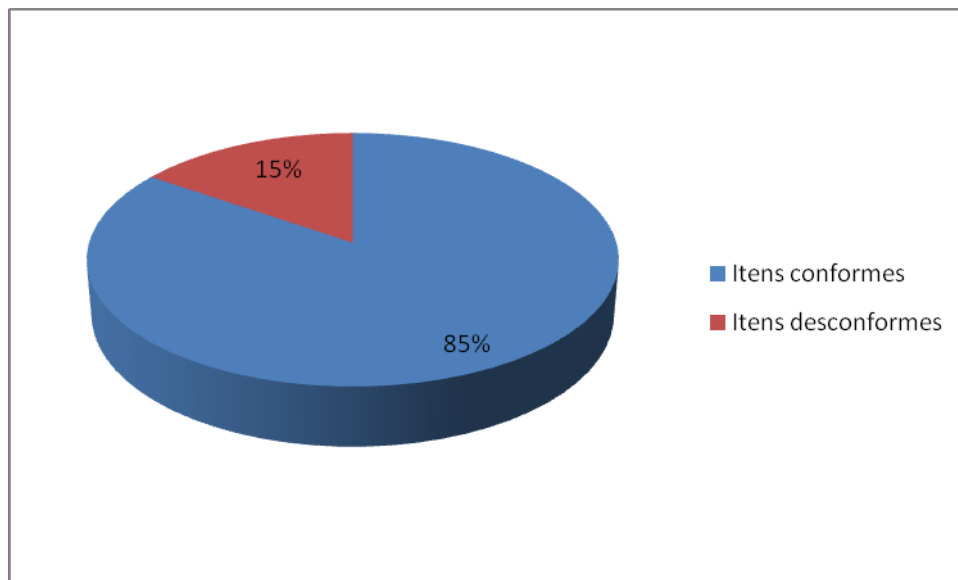
Cerca de 30 funcionários estão envolvidos nesta linha de produção, sendo que apenas 22 mulheres fazem o beneficiamento propriamente dito dos camarões, ou seja, a manipulação direta do produto.

5.3 Avaliação Higiênico-Sanitária

O entreposto de pescados foi avaliado de acordo com os parâmetros indicados no Anexo II da RDC 275 (BRASIL, 2002), intitulado “Lista de verificação das boas práticas de fabricação em estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos”. Foram observados 163 itens, dos quais 156 foram aplicáveis. De acordo com o

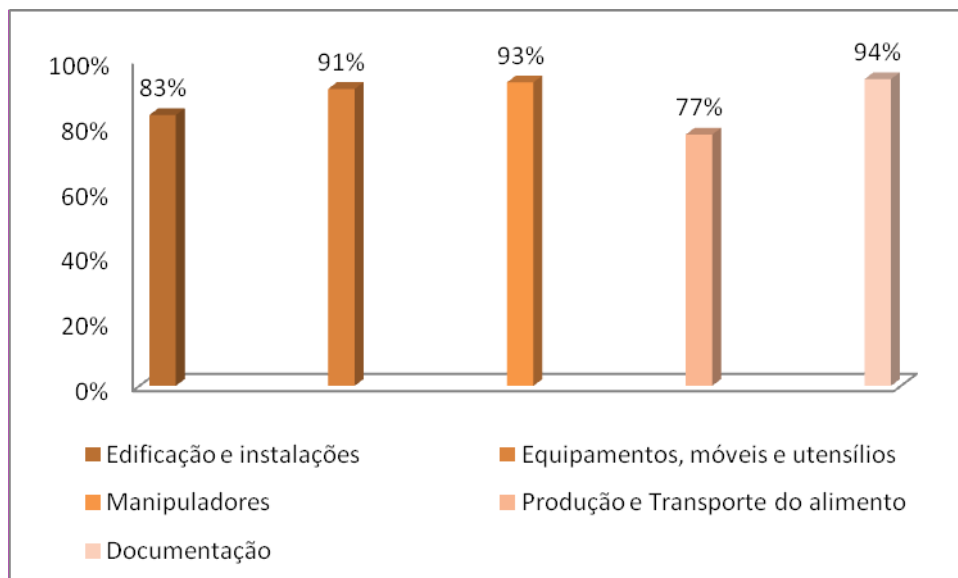
preenchimento da lista, o entreposto foi classificado no Grupo 1 (76% a 100% de atendimento aos itens), pois houve 132 conformidades e 24 inadequações nos itens checados, como mostra a Figura 9 em dados percentuais.

Figura 9. Percentual de adequação dos itens avaliáveis em entreposto de pescado do município de Recife, Pernambuco, segundo a RDC 275/2002.



Os 156 itens avaliados dividem-se em cinco categorias principais: Edificação e instalações; equipamentos, móveis e utensílios; manipuladores, produção e transporte do alimento e documentação. A Figura 10 ilustra o percentual de adequações dentro de cada categoria.

Figura 10. Percentual de adequações de cada categoria da lista de verificação segundo a RDC 275/2002, em entreposto de pescado do município de Recife, Pernambuco.



Como é possível observar na Figura 10, a categoria que obteve mais não-conformidades, foi a de Produção e Transporte do alimento. Tais inadequações foram observadas nos itens sobre o controle de qualidade do produto final (nenhuma conformidade) e sobre a matéria-prima, ingredientes e embalagens e fluxo de produção (três não conformidades). Tal situação pode ser justificada pelo fato de a empresa ainda estar passando pelo processo de retirada do SIE (Selo de Inspeção Estadual), necessitando ainda de muitos ajustes em seus processos.

5.4 Análises microbiológicas

Das 39 amostras analisadas, apenas uma foi positiva para *Listeria* sp., sendo a espécie encontrada, *L. innocua*.

Na tabela 2 estão apresentados os resultados da identificação bioquímica das amostras que tiveram crescimento; a lista com as provas bioquímicas realizadas estão no Anexo 2.

Microrganismos	Amostras
<i>Enterococcus faecalis</i>	Piso do salão de beneficiamento (<i>swab</i>), parede do salão de beneficiamento (<i>swab</i>), basqueta de camarão (<i>swab</i>), mão de manipulador (<i>swab</i>), camarão sem cabeça,

	filé de camarão
<i>Staphylococcus aureus</i>	Parede do salão de beneficiamento (<i>swab</i>), mão de manipulador (<i>swab</i>)
<i>Myroides sp.</i>	Basqueta de camarão (<i>swab</i>)
<i>Staphylococcus xylosus</i>	Mão de manipulador (<i>swab</i>), cortina da câmara de espera (<i>swab</i>)
<i>Staphylococcus warneri</i>	Mão de manipulador (<i>swab</i>)
<i>Staphylococcus sciuri</i>	Container de gelo (<i>swab</i>)
<i>Listeria innocua</i>	Piso da câmara de espera (<i>swab</i>)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Parede da câmara de espera (<i>swab</i>)
<i>Micrococcus luteus/lyae</i>	Container de gelo (<i>swab</i>)

Tabela 2. Resultados das análises bioquímicas realizadas por equipamento VITEK®2 (*Biomeriëux*) nas amostras que apresentaram crescimento microbiano em placas de ágar sangue.

Alguns estudos têm demonstrado que a presença de *L. innocua* pode mascarar *L. monocytogenes*, o que poderia levar a um resultado falso-negativo para presença de *L. monocytogenes* (CORNU et al.,2002). Segundo Allerberger (2002), das espécies do gênero *Listeria*, apenas *L. monocytogenes* é considerada como significante patógeno humano e animal, embora haja relatos de infecções humanas causadas por *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, e *L. ivanovii*. Esse mesmo autor afirma que mesmo presente de forma generalizada no meio ambiente e nos alimentos, *L. innocua* é considerada uma bactéria não patogênica. Apesar dessas informações já houve relato de morte em paciente não comprometido imunologicamente, por bacteremia provocada por *L. innocua*, na França (PERRIN, 2003).

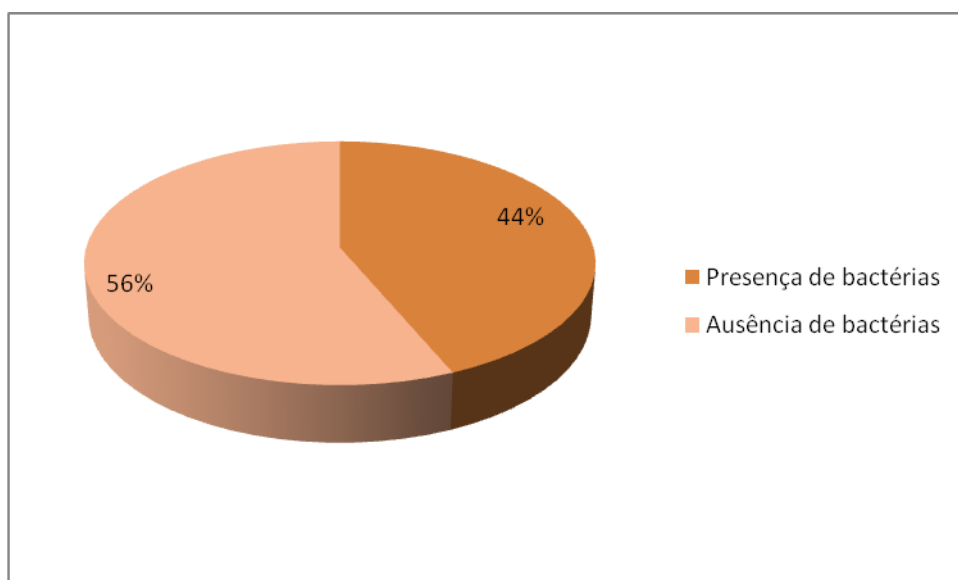
Dessa forma, é importante o monitoramento microbiológico de indústrias de alimentos, mesmo em relação a patógenos não comumente relatados na literatura como patogênicos; sendo relevante para verificação da interação entre microrganismos e suas consequências num ambiente de processamento, bem como para o surgimento de novas informações a respeito de microrganismos até então não considerados de risco, ou preocupantes do ponto de vista da contaminação e transmissão de doença alimentar.

5.5 Análise Estatística

Das 39 amostras coletadas, 17 mostraram a presença de bactérias, ou seja, a contaminação está presente em 44% das amostras, aproximadamente.

Segue abaixo a Figura 11 que apresenta os resultados da presença de microrganismos nas amostras:

Figura 11. Distribuição percentual do crescimento microbiano no total de amostras coletadas



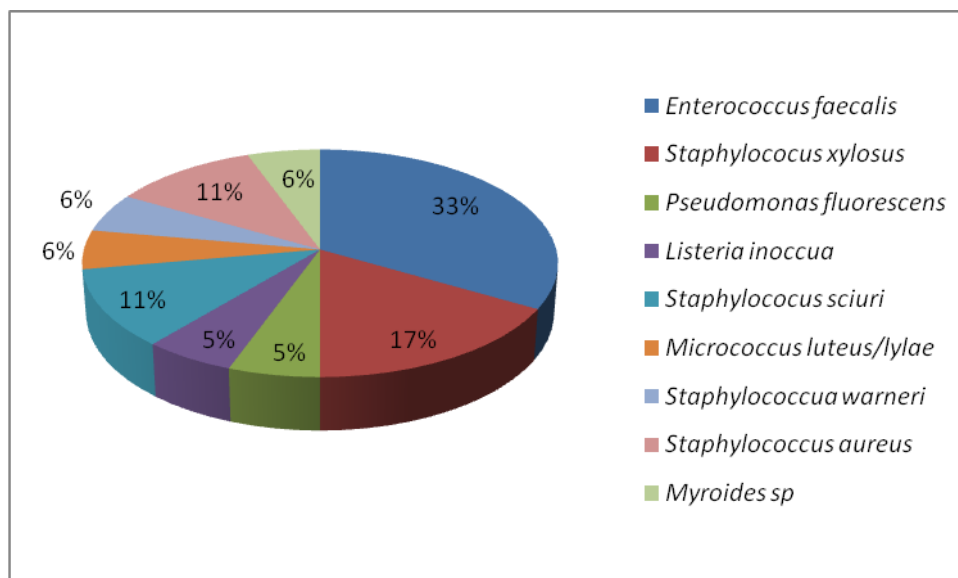
Com base nas 18 ocorrências de crescimento microbiano, pôde-se determinar a frequência dos microrganismos encontrados nas análises (Tabela 3; Figura 12).

Tabela 3. Frequência das bactérias encontradas nas amostras

Bactéria	Frequência
<i>Enterococcus faecalis</i>	33,33%
<i>Staphylococcus xylosus</i>	16,67%
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5,56%
<i>Listeria innocua</i>	5,56%
<i>Staphylococcus sciuri</i>	11,11%
<i>Micrococcus luteus/lylae</i>	5,55%
<i>Staphylococcua warneri</i>	5,56%

<i>Staphylococcus aureus</i>	11,11%
<i>Myroides</i> sp.	5,55%
Total	100%

Figura 12. Frequência de ocorrência das bactérias encontradas nas amostras que apresentaram crescimento microbiano



Enterococcus faecalis foi a bactéria mais presente entre as amostras, com 6 registros. É uma bactéria de origem fecal e, portanto, sugere a contaminação através de maus hábitos do manipulador ou utilização de água contaminada nas áreas que fazem parte do processo industrial. De acordo com Todd et al. (2010), muitos relatórios de investigação de surto de origem alimentar têm identificado as mãos de manipuladores de alimentos como fonte de patógenos nos alimentos implicados; a maneira mais conveniente e eficiente de remoção de patógenos das mãos é através de lavar as mãos. Estes autores ressaltam que a lavagem das mãos deve acontecer antes e depois da manipulação de alimentos e deve ser feita com sabões antimicrobianos, levando em consideração que o tempo e o grau de fricção no ato da lavagem de mãos são mais importantes do que a temperatura da água para a remoção de microrganismos.

Quatro espécies de *Staphylococcus* sp. foram encontradas em 8 amostras, de um total de 18. Dentre as espécies conhecidas deste gênero, *S.aureus* (encontrada em 2 amostras) é considerada a mais patogênica e resistente a antimicrobianos; é uma bactéria comumente encontrada na pele e vias aéreas de mais de 25% das pessoas

saudáveis e animais e tem a habilidade de produzir 7 diferentes toxinas que são frequentemente responsáveis por intoxicação alimentar (CDC, 2010).

S. xyloso (encontrado em 3 amostras) foi determinado como sendo microbiota produtora de histamina em pescado, segundo Lin et al. (2012) que compilou vários autores que estudaram o tema, o que trás a possibilidade de risco desse microrganismo quando inserido num ambiente de manipulação de pescado.

Pseudomonas fluorescens, bactéria encontrada na parede da câmara de espera, é uma bactéria que causa deterioração numa variedade de ambientes alimentares. Recentemente, Ibusquiza et al. (2012) revelaram que algumas cepas de *Pseudomonas* pode aumentar a colonização de superfícies inertes por *Listeria monocytogenes* e/ou proteger essa bactéria patogênica contra a ação dos desinfetantes. Esta bactéria é também reconhecida como um organismo modelo para estudos de biofilme, uma vez que pode facilmente formar biofilmes de diferentes simulações laboratoriais (SILLANKORVA et al., 2008).

Os demais gêneros encontrados não são notadamente patogênicos, mas possuem características importantes, como formação de biofilme que favorece estabelecimento de outras bactérias, a exemplo do *Myroides* sp. (JACOBS e CHENIA, 2009). *Micrococcus luteus/lylae* está presente na água, solo e pele e é considerada uma bactéria indicadora do grupo dos coliformes (ILUSANYA et al., 2012).

6. CONCLUSÃO

Das 39 amostras analisadas, uma foi positiva para *Listeria* sp., sendo a espécie encontrada *L. innocua*. O entreposto de pescado foi classificado no Grupo 1, de acordo com a lista de verificação da RDC 275/2002. A análise automatizada no equipamento VITEK®2 mostrou uma diversidade de nove tipos de bactérias diferentes.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATI, M.; GELINSKI, J. M. L. N.; BARATTO, C. M. Evidência Interdisciplinar , n. 2, v. 12, p. 187-196. 2012.

ALLERBERGER, F. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. **Fems Immunology and Medical Microbiology**. n. 3, v. 35, p. 183-189. 2002.

ALLERBERGER, F. ; WAGNER, M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. **Clinical Microbiology and Infection**, n. 1, v. 16, p. 16-23. 2010.

ANDRADE, N. J.; MACEDO, J. A. B Higienização na Indústria de Alimentos. 1. ed. São Paulo: Varela, 1996. 182p.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 19th edition. 2012. Disponível em: <http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/OMA/OMA19Revisions.pdf>. Acessado em 22 de janeiro de 2014.

ATASSOVA, V.; REICH, F.; KLEIN, G. Microbiological quality of sushi from sushi bars and retailers. **Journal of Food Protection**, n. 4, v. 5, p. 860-864. 2008.

BIOMÉRIEUX. VITEK®2 Compact Instrument User Manual. 2004. Disponível em: <http://www.frankshospitalworkshop.com/equipment/documents/automated_analyzer/user_manuals/Biomerieux%20Vitek%20-%20User%20manual.pdf>. Acessado em 21 de janeiro de 2014.

BIOMÉRIEUX. VITEK®2 Gram-positive Identification Card Method for the Identification of Selected Gram-positive Organisms: AOAC Performance Tested MethodSM. Final Report. 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Diretoria Colegiada nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**,

Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acessado em: 16 nov 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Diretoria Colegiada nº 275, de 21 de outubro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 de outubro de 2003. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/dcf7a900474576fa84cfd43fbc4c6735/RDC+N%C2%BA+275,+DE+21+DE+OUTUBRO+DE+2002.pdf?MOD=AJPERES>>. Acessado em: 10 jan 2013.

IBUSQUIZA, P. S.; HERRERA, J. J. R.; VASQUÉZ-SANCHÉZ, D. Adherence kinetics, resistance to benzalkonium chloride and microscopic analysis of mixed biofilms formed by *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas putida*. *Food Control*, n. 1, v. 25, p. 202–210. 2012.

CAVALCANTE, L. C.; MOREIRA, M. C.; MOTA, O. M. DE L.; TURATTI, E.; VIANA, F. A. C.; PEREIRA, S. L. DA S. Efeito da pedra umes no processo de cicatrização tecidual. Estudo histológico em dorso de ratos. **Periodontia**, n. 1, v. 22, p. 69-73. 2012.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases - Staphylococcal Food Poisoning**. 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/staphylococcal/>>. Acessado em 20 de janeiro de 2014.

CONTI, F. **Muitas Dicas – Biometria Qui Quadrado**. 2009. Laboratório de Informática UFPA. Disponível em: <<http://www.ufpa.br/dicas/biome/biopdf/bioqui.pdf>>. Acessado em 29 de janeiro de 2014.

CORNU, M., KALMOKOFF, M., FLANDROIS, J. P. Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. **International Journal of Food Microbiology**, n. 2-3, v. 73, p. 261–274. 2002.

DEL PILAR CRESPO, M. ; VÉLEZ, J.D. ; CASTAÑEDA, C. ; HOYOS, F. ; LÓPEZ, M.L. ; SALAZAR, J.C. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en un Hospital de tercer nivel. *Colombia Medica*, n. 2, v. 30, p. 89-98. 1999.

DENNY, J.; MCLAUHLIN, J. Human *Listeria monocytogenes* infections in Europe - an opportunity for improved European surveillance. *Eurosurveillance : European communicable disease bulletin*, n. 13, v. 13. 2008.

FAO – Food and Agriculture Organization. Fisheries and Aquaculture Department. **Cultured Aquatic Species Information Programme - *Penaeus vannamei* (Boone, 1931)**. 2012. Disponível em: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/en. Acessado em: 03 nov 2012.

FDA – Food and Drug Administration. FDA Food Safety Modernization Act - **Food Safety Legislation Key Facts. 2011**. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FSMA/default.htm>. Acessado em 02 nov 2012.

FOGAÇA, F. H. S. **A importância do manejo higiênico-sanitário na qualidade do pescado**. Artigos Técnicos – Embrapa. 2009. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2009/a-importancia-do-manejo-higienico-sanitario-na-qualidade-do-pescado/>. Acessado em 20 de janeiro de 2014.

FRANCO, Â. M. P.; CASSOL, E. A.; PAULETTO, E. A.; INDA, A. V. Erodibilidade do solo em entressulcos determinada experimentalmente e por modelos matemáticos em um argissolo vermelho. **R. Bras. Agrobiologia**, v.18, n. 2-4, p. 175-187. 2012.

FREITAS, L. H. **Sistema especialista para diagnóstico de toxinfecções alimentares de origem bacteriana**. 1995. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.

GUEDES, I. B.; COSTA, M. S. F.; LIMA, A. S.; RODRIGUES, J. A. M.; SILVA, M. C.; NASCIMENTO, K. S. C.; DIAS, H. L. T. Isolamento de microrganismos presente nos ambientes de um entreposto de pescado na região metropolitana de Belém-Pará. In:

Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 38, 2011. Florianópolis/SC. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, número especial. Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, 2011.

GHENGHESH, K.S. ; AHMED, S.F. ; EL-KHALEK, R.A. ; AL-GENDY, A. ; KLENA, J. *Aeromonas*-associated infections in developing countries. **Journal of Infection in Developing Countries**, n.2, v.2, p.81-98. 2008.

JACOBS, A.; CHENIA, H. Y. Biofilm-forming capacity, surface hydrophobicity and aggregation characteristics of *Myroides odoratus* isolated from South African *Oreochromis mossambicus* fish. **Journal of Applied Microbiology**, n. 6, v. 107, p. 1957-1966. 2009

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

HUSS, H. H., JØRGENSEN, L. V., & VOGEL, B. F. Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods. **International Journal of Food Microbiology**, n. 3, v. 62, p. 267 e 274. 2000.

ILUSANYA, O. A. F.; ADESANYA, O.O.; ADESEMOWO, A.; AMUSHAN, N.A. Personal Hygiene and Microbial Contamination of Mobile Phones of Food Vendors in Ago-Iwoye Town, Ogun State, Nigeria. **Pakistan Journal of Nutrition**, n. 3, v. 11, p. 276-278. 2012.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**, 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JOHANSSON, T., RANTALA, L., PALMU, L., & HONKANEN-BUZALSKI, T. Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum-packed fish products and in a production plant. **International Journal of Food Microbiology**, n.1-2, v. 47, p. 111 e 119. 1999.

LAKICEVIC, B. STJEPANOVIC, A. MILIJASEVIC, M. TERZIC-VIDOJEVIC, A. GOLIC, N. TOPISIROVIC, L. The presence of *Listeria monocytogenes* in a chosen

food processing establishment in Serbia. **Archives Biological Sciences**, v. 62, n.4, p. 881-887, 2010.

LAPENDA, A. M. V. S. **Ocorrência de *Listeria* sp. em Embutidos Resfriados Comercializados na Cidade do Recife – PE**. 2010. 74f. Dissertação. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

LIN, C.-S.; LIUB, F.-L.; LEE, Y.-C.; HWANG, C.-C.; TSAI, Y.-H. Histamine contents of salted seafood products in Taiwan and isolation of halotolerant histamine-forming bactéria. **Food Chemistry**, n. 2, v. 131, p. 574-579. 2012.

LOTZ, J. M. **Effect of host size on virulence of Taura Virus to the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae)**. Diseases of aquatic Organisms, 1997. Disponível em: <[www.FactsheetforLitopenaeusvannamei\(Boone, 1931\)](http://www.FactsheetforLitopenaeusvannamei(Boone,1931))>. Acessado em 3 nov 2012.

MAGALHÃES, M. E. S. **Cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) em sistema multifásico**. 2004. 60f. Dissertação. (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2004.

MARIN, V. A., LEMOS, A. A.; FREITAS, E. I. Detecção de patógenos presentes nos alimentos: A falta de padronização e validação de métodos moleculares no Brasil. **Higiene Alimentar**, n. 145, v. 20, p. 46-50. 2006.

MOURA, E. F.; DANTAS, T. N. C.; SANTOS, M. J. Contaminação de camarão no comércio do Natal-RN por resíduo de SO₂ devido ao uso de metabissulfito. **Revista da FARN**, n. 1, v.7, p. 63-71. 2008.

NEIVA, C. R. P. **Valor Agregado X Qualidade do Pescado**. Laboratório de Tecnologia do Pescado. 2007. Disponível em <[ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/cristiane.pdf](http://ftp.sp.gov.br/ftppesca/cristiane.pdf)> acesso em: 19 de janeiro de 2014.

PERRIN, M., BEMER, M., DELAMARE, C. Fatal Case of *Listeria innocua* Bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 11, v. 41, p. 5308-5309. 2003.

PINTO, J. & NEVES, R. **Análise De Riscos No Processamento Alimentar**. Porto: Publindústria, Edições Técnicas. 2010.

PINTO, U. M.; CARDOSO, R. R.; VANETTI, M. C. D. Detecção de *Listeria*, *Salmonella* e *Klebsiella* em serviço de alimentação hospitalar. **Revista de Nutrição**, n. 3, v. 17, p. 319-326. 2004.

PINTO, A. M. T. P.; HIRDES, I. M.; SANCHES FILHO, P.J. Determinação de metais pesados nos camarões (*Farfantepenaeus paulensis*) consumidos na cidade de Pelotas-RS. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**. n. 1, v.8, p. 129-134. 2013.

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde. **Higiene dos Alimentos – Textos Básicos** / Organização Pan-Americana da Saúde; Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Food and Agriculture Organization of the United Nations. – Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2006. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/alimentos/codex_alimentarius.pdf>.

Acessado em 02 nov 2012.

ROCOURT, J., BUCHRIESER, C. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenic position, taxonomy and identification. In E. T. Ryser, & E. H. Marth (Eds.), **Listeria, listeriosis, and food safety** (pp. 1e20). New York: Marcel Dekker. 2007.

SANTANA, M. F. A.; PEREIRA, A. J. **Cultivo do Camarão Marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone,1931) em Viveiros Estuáricos de Itamaracá-PE. 2002.** 63f. Dissertação. (Mestrado em Oceanografia) - Universidade Federal de Pernambuco Centro de Geociências, Dept. de Oceanografia, Recife, 2002.

SANTOS, C. A. M. L. **A qualidade do pescado e a segurança dos alimentos.** II Simpósio de Controle do Pescado: 2006: São Paulo, SP. Disponível em:

<ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/qualidade_pescado.pdf>. Acessado em 03 de janeiro de 2014.

SATOKO, H.; BON K.; HAJIME T.; TAKASHI, K.; KAZUO, H.; TATEO, F. Incidence of *Listeria monocytogenes* in Raw Seafood Products in Japanese Retail Stores **Journal of Food Protection®**, n. 2, v.5, p. 411-415. 2005.

SAUDERS, B. D., WIEDMANN, M.. Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. In E. T. Ryser, & E. H. Marth (Eds.), *Listeria, listeriosis, and food safety* (p. 21 e 53). New York: Marcel Dekker. 2007.

SEELIGER, H. P. R., JONES, D. *Listeria*. In P. H. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, & J. G. Holt (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology** (Vol. 2, pp. 1235–1245). Baltimore, US: Williams and Wilkins Co. 1986.

SILLANKORVA, S.; NEUBAUER, P.; AZEREDO, J. *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiIBB-PF7A. **BMC Biotechnology**, n. 79, v. 8. 2008.

SILVA, I. M. M. ALMEIDA, R.C.C. ALVES, M.A.O. ALMEIDA, P.F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, n. 3, p. 241-248, 2003.

SILVA, C. G. **Detecção rápida de psicrotóxicos em leite e monitoramento de *Listeria* spp. no ambiente de processamento de laticínios**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia, 2006, 33p. (Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – SVS. BRASIL. **Dados epidemiológicos – DTA período de 2000 a 2013**. 2013.

TODD, E. C. D.; MICHAELS, B. S.; SMITH, D.; GREIG, J. D.; BARTLESON, C. A. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease.

Part 9. Washing and drying of hands to reduce microbial contamination. **Journal of Food Protection**, n. 10, v. 73, p. 1937-1955, 2010.

TODD, E. C. D., NOTERMANS, S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, n. 22, p. 1484-1490. 2011.

VARMA, J. K.; SAMUEL, M. C.; MARCUS, R.; HOEKSTRA, R. M.; MEDUS, C.; SEGLER, S.; ANDERSON, B. J.; JONES, T. F.; SHIFERAW, B.; HAUBERT, N.; MEGGINSON, M.; McCARTHY, P. V.; GRAVES, L.; VAN GILDER, T.; ÂNGULO, F. J. *Listeria monocytogenes* infection from foods prepared in a commercial establishment: a case-control study of potential sources of sporadic illness in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, n. 44, p.521-528. 2007.

WAN NORHANA, M. N., POOLE, S. E., DEETH, H. C., DYKES, G. A. Prevalence, persistence and control of Salmonella and Listeria in shrimp and shrimp products: a review. **Food Control**, n. 4, v. 21, p.343-361. 2010.

WHO – World Health Organization. 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety/en/>>. Acessado em 12 jul 2012.

XIMENES, L. J. F.; VIDAL, M. F.; FEITOSA, R. A. Recuperação da Carcinitultura Nordestina Pós-Crise. Banco do Nordeste - **Informe Rural ETENE**, ano V, nº 15. Disponível em: <http://www.bnb.gov.br/content/aplicacao/etene/etene/docs/ire_ano5_n15.pdf>. Acessado em 01 de fevereiro de 2014.

8. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Das amostras de camarão e *swabs* dos ambientes e das mãos dos manipuladores analisadas, apenas uma foi positiva para *Listeria innocua*. Porém, foram encontrados outros microrganismos nas amostras, revelando uma contaminação microbiológica do ambiente de processamento o que pode levar à contaminação do produto final e favorecimento de proliferação de outros patógenos. Deve-se, portanto, elevar a prioridade do controle de qualidade e manter o monitoramento microbiológico

do ambiente e dos alimentos produzidos, garantindo dessa forma, que chegue ao consumidor final um produto seguro à saúde.

Anexos

ANEXOS

Anexo 1: Amostras e sua identificação

Número de identificação da amostra	Local de amostragem
1	Piso do salão
2	Parede do salão
3	Mesa de manipulação 1
4	Mesa de manipulação 2
5 a 14	Basquetas de camarão
15 a 25	Mãos dos colaboradores com luvas
26 a 28	Containers de gelo
29	Saco de embalagem
30	Teto do salão
31	Piso da câmara de espera
32	Parede da câmara de espera
33	Porta da câmara de espera
34	Cortina da câmara de espera
35	Teto da câmara de espera
36	Camarão inteiro
37	Camarão Tailon
38	Camarão sem cabeça
39	Filé de camarão

A amostra 2 apresentou 2 tipos de bactérias diferentes.

Anexo 2: Provas Bioquímicas realizadas pelo equipamento VITEK®2

2.1 Para amostras Gram-Positivas:

Poço	Sigla	Teste	Qtde/poço (mg) ²
2	AMY	D-AMIGDALINA	0.1875
4	PIPLC	FOSFATIDILINOSITOL FOSFOLIPASE	0.015
5	dXYL	D-XILOSE	0.3
8	ADH1	ARGININA DIHIDROLASE 1	0.111
9	BGAL	BETA-GALACTOSIDASE	0.036

11	AGLU	ALFA-GLUCOSIDASE	0.036
13	APPA	Ala-Fe-Pro ARILAMIDASE	0.0384
14	CDEX	ALFA-GLUCOSIDASE	0.3
15	AspA	L-Aspartato ARILAMIDASE	0.024
16	BGAR	BETA GALACTOPIRANOSIDASE	0.00204
17	AMAN	ALFA-MANOSIDASE	0.036
19	PHOS	FOSFATASE	0.0504
20	LeuA	Leucina ARILAMIDASE	0.0234
23	ProA	L-Prolina ARILAMIDASE	0.0234
24	BGURr	L-Prolina ARILAMIDASE	0.0018
25	AGAL	ALFA-GALACTOSIDASE	0.036
26	PyrA	L-PIRROLIDONIL ARILAMIDASE	0.018
27	BGUR	BETA-GLUCURONIDASE	0.0378
28	AlaA	Alanina ARILAMIDASE	0.0216
29	TyrA	Tirosina ARILAMIDASE	0.0276
30	dSOR	D-SORBITOL	0.1875
31	URE	UREASE	0.15
32	POLYB	Resistência à POLIMIXINA B	0.00093
37	dGAL	D-GALACTOSE	0.3
38	dRIB	D-RIBOSE	0.3
39	ILATk	Alcalinização L-LACTATO	0.15
42	LAC	LACTOSE	0.96
44	NAG	N-ACETIL-D- GLUCOSAMINA	0.3
45	dMAL	D-MALTOSE	0.3
46	BACI	Resistência à BACITRACINA	0.0006
47	NOVO	Resistência à NOVOBIOCINA NOVO	0.000075
50	NC6.5	Crescimento em NaCl 6,5%	1.68

52	dMAN	D-MANITOL	0.1875
53	dMNE	D-MANOSE	0.3
54	MBdG	METIL-B-D- GLUCOPIRANOSIDA	0.3
56	PUL	PULULANO	0.3
57	dRAF	D-RAFINOSE	0.3
58	O129R	Resistência a O/129	0.0084
59	SAL	SALICIN	0.3
60	SAC	SACAROSE/SUCROSE	0.3
62	dTRE	D-TREALOSE	0.3
63	ADH2s	ARGININA DIHIDROLASE 2	0.27
64	OPTO	Resistência à OPTOQUINA	0.000399

NOTA: 1. Alguns poços encontram-se vazios **2.** Quantidade do substrato liofilizado por poço em miligramas.

2.2 Para amostras Gram-Negativas:

Poço	Sigla	Teste	Qtde/poço (mg) ²
2	APPA	Ala-Fe-Pro ARILAMIDASE	0,0384
3	ADO	Adonitol	0,1875
4	PyrA	L-PIRROLIDONIL ARILAMIDASE	0,018
5	IARL	L-ARABITOL	0,3
7	dCEL	D-CELOBIOSE	0,3
9	BGAL	BETA-GALACTOSIDASE	0,036
10	H2S	Produção de H2S	0,0024
11	BNAG	BETA-N-ACETIL- GLUCOSAMINIDASE	0,0408
12	AGLTp	Glutamil Arilamidase pNA	0,0324
13	dGLU	D-GLUCOSE	0,3
14	GGT	GAMA-GLUTAMIL- TRANSFERASE	0,0228

15	OFF	FERMENTAÇÃO/GLUCOSE	0,45
17	BGLU	BETA-GLUCOSIDASE	0,036
18	dMAL	D-MALTOSE	0,3
19	dMAN	D-MANITOL	0,1875
20	dMNE	D-MANOSE	0,3
21	BXYL	BETA-XILOSIDASE	0,0324
22	BAlap	BETA-Alanina arilamidase pNA	0,0174
23	ProA	L-Prolina Arilamidase	0,0234
26	LIP	LIPASE	0,0192
27	PLE	PALATINOSE	0,3
29	TyrA	Tirosina ARILAMIDASE	0,0276
31	URE	UREASE	0,15
32	dSOR	D-SORBITOL	0,1875
33	SAC	SACAROSE/SUCROSE	0,3
34	dTAG	D-TAGATOSE	0,3
35	Dtre	D-TREALOSE	0,3
36	CIT	CITRATO (SÓDIO)	0,054
37	MNT	MALONATO	0,15
39	5KG	5-QUETO-D-GLUCONATO	0,3
40	ILATk	Alcalinização L-LACTATO	0,15
41	AGLU	ALFA-GLUCOSIDASE	0,036
42	SUCT	Alcalinização SUCINATO	0,15
43	NAGA	Beta-N-ACETIL- GALACTOSAMINIDASE	0,0306
44	AGAL	ALFA-GALACTOSIDASE	0,036
45	PHOS	FOSFATASE	0,0504
46	GlyA	Assimilação Glicina ARILAMIDASE	0,012
47	ODC	ORNITINA DESCARBOXILASE	0,3
48	LDC	LISINA DESCARBOXILASE	0,15

53	IHISa	Assimilação L-HISTIDINA	0,087
56	CMT	CUMARATO	0,126
57	BGUR	BETA-GLUCORONIDASE	0,0378
58	O129R	Resistência a O/129	0,0105
59	GGAA	Glu-Gli-Arg-ARILAMIDASE	0,0576
61	IMLTa	Assimilação L-MALATO	0,042
62	ELLM	ELLMAN	0,03
64	ILATa	Assimilação L-LACTATO	0,186

NOTA: 1. Alguns poços encontram-se vazios **2.** Quantidade do substrato liofilizado por poço em miligramas.