

Revista Higiene Alimentar

abril de 2002

volume 16 - n° 95



ISSN 0101-9171

Indizada nas seguintes
bases de dados:
CAB ABSTRACTS (Inglaterra)
LILACS-BIREME (Brasil)
PERNETAL/OLUP (Brasil)

Afiliada à ABEC
Associação Brasileira de
Editores Científicos

STAPHYLOCOCCUS AUREUS EM MAIONESE: COMO EVITAR?

Alimento tradicional, cujo preparo envolve várias matérias-primas e intensa manipulação, a maionese pode oferecer condições de multiplicação para alguns patogênicos, pondo em risco a saúde do consumidor.

- ♦ FUMONISINAS EM MILHO
- ♦ COLIFORMES EM ÁGUA DE ABASTECIMENTO
- ♦ PREPARO DE CARNE PARA MERENDA ESCOLAR
- ♦ HACCP NA PRODUÇÃO DE FRANGO CONGELADO
- ♦ SALSICHAS VIENA, COM ÓLEO VEGETAL E FIBRA DE TRIGO

LEIA TAMBÉM OUTROS TRABALHOS INÉDITOS.

ASPECTOS HIGIÊNICO-SANITÁRIOS NO PREPARO DE CARNE BOVINA SERVIDA EM REFEIÇÕES ESCOLARES DE INSTITUIÇÕES MUNICIPAIS E ESTADUAIS, NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.

Prof MSc Jorge Luiz Fortuna
UNEB Ciências Biológicas - Campus X
Mat. 74.436.529-5 / CRBio 21.646-02

Jorge Luiz Fortuna

Faculdade de Veterinária - Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ.

RESUMO

As condições higiênico-sanitárias dos alimentos preparados em cozinhas de instituições de ensino, são baseadas em fatores importantes, como processo de produção deste alimento, técnica de preparo, higiene das mãos dos manipuladores e dos utensílios, temperatura e tempo de cozimento e também de produção, distribuição e estocagem. Estes fatores interferem diretamente sobre a microbiota contaminante existente no alimento que está sendo preparado. Este trabalho teve

como objetivo avaliar as condições higiênico-sanitárias na preparação de carne bovina servida em refeições escolares (merenda escolar), em instituições municipais e estaduais de ensino, através da contagem de *Staphylococcus aureus*, Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Fecais e contagem de *Clostridium perfringens*; e investigar as condições higiênico-sanitárias dos manipuladores de alimentos e de utensílios da cozinha, usando-se swabs para a coleta de espécimes para as análises microbiológicas supra-citadas. Também foram ava-

liadas as condições higiênico-sanitárias da água de abastecimento destas instituições de ensino. Foram analisadas 22 amostras de carne bovina, servida na merenda escolar de escolas municipais e estaduais, antes e após cocção; e swabs usados nas mãos e faca de corte de carne antes do seu uso, respectivamente, em cada coleta. Foram coletadas, também, amostras de água no interior das cozinhas. Os métodos empregados foram baseados nos recomendados pela Associação Americana de Saúde Pública (American Public Health Association - APHA). As técnicas microbiológicas utilizadas na pesquisa permitiram avaliar diferentes características associadas à microbiota presente na carne crua, carne cozida, mãos de manipuladores e utensílios. Das 88 amostras subdivididas em carne crua; carne cozida; swab de mão e utensílio, 100% apresentaram ausência de *S. aureus*. Não foi detectada a presença de *C. perfringens* nas amostras analisadas. Do total de 22 amostras, de carne crua, oito (36,36%) apresentaram uma variação do NMP de coliformes fecais de $0,9 \times 10^1$ a $>1,1 \times 10^3$. As condições higiênico-sanitárias na preparação de carne bovina servida na merenda escolar é satisfatória, pois apenas duas amostras de carne crua (9,1%) encontraram-se acima dos padrões; porém, a cocção adequada extinguiu esta contaminação. As condições higiênico-sanitárias dos manipuladores, dos utensílios da cozinha e da água de abastecimento nestas instituições de ensino encontram-se em condições satisfatórias, sem comprometimento da saúde pública.

PALAVRAS-CHAVE: carne bovina; bacteriologia; higiene; merenda escolar.

SUMMARY

The sanitary and hygienic conditions of the foods prepared in educa-

tional institution kitchens are based on important factors such as: food production process, preparation technique, hygienic conditions of food handling and the kitchen utensils, temperature and cooking time, and distribution and storage conditions. These issues affect directly the microbiologic conditions of the food that is being prepared. The objective of this study is to evaluate the hygienic and sanitary conditions in the preparation of meat used as school meal in the municipal and state institutions, through the *Staphylococcus aureus* count, fecal coliform estimation by the Most Probable Number (MPN), the *Clostridium perfringens* count, and to investigate the hygienic and sanitary conditions of the food handling and kitchen utensils, using swabs for specimen collection to perform the microbiological analysis. There was also an evaluation of the sanitary and hygienic conditions of the water supply of these educational institutions. Twenty two (22) samples of meat served on the school meal of municipal and state institutions were analyzed, before and after cooking; and swabs used on hands of manipulators and knives before manipulation. There was also collection of samples of the water supply used in the kitchens. The methods applied were based on the recommendation of the American Public Health Association (APHA). The microbiological techniques used in this study allow evaluating different characteristic associates with the microorganisms in the raw and cooked meat, manipulator hands and kitchen utensils. The 88 samples (raw meat, cooked meat, manipulators hands and kitchen utensils) presented absence of *S. aureus*. It was not detected *C. perfringens* in the samples. Eight of the 22 samples (36,36%) of raw meat presented variations on the fecal coliform MPN from $0,9 \times 10^1$ to $>1,1 \times 10^3$. The hygienic and sanitary conditions during meat preparation in the school meal was satisfactory, because only two samples of raw meat (9,1%) were above the allowed limits, but the adequate cooking eliminated the

contamination. The hygienic and sanitary conditions of the manipulators, kitchen utensils and water supply of these educational institutes were satisfactory and do not affect the public health.

INTRODUÇÃO

As condições higiênico-sanitárias dos alimentos preparados em cozinhas industriais (fábricas, indústrias, escolas, hospitais, etc.), como também em pequenas cozinhas (como as existentes em nossas casas), são baseadas em fatores importantes como, processo de produção do alimento, técnica de preparo, higiene das mãos dos manipuladores e dos utensílios, temperatura e tempo de cozimento e também de produção, distribuição e estocagem deste alimento. O binômio tempo-temperatura é de grande importância, já que o tempo e a temperatura de cozimento irão interferir diretamente sobre a microbiota contaminante existente no alimento que está sendo preparado. Porém é importante ratificar que todos os fatores descritos acima são importantes em cada etapa da produção e/ou preparação do alimento.

Mesmo tendo-se poucos relatos de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (D.T.A.), registrados nos Serviços de Saúde, supõe-se que a ocorrência seja maior, pois há uma precariedade do saneamento básico em nosso meio, assim como há falhas nos cuidados técnicos e, principalmente, no que diz respeito aos aspectos higiênico-sanitários no preparo dos alimentos.

A não utilização das medidas higiênico-sanitárias poderá, conseqüentemente, levar a uma contaminação em qualquer tipo de alimento. Diante deste possível risco à saúde pública, justifica-se este trabalho, relacionado-o aos aspectos higiêni-

co-sanitários inadequados de manipuladores dos alimentos e de utensílios utilizados em cozinha institucional, que possam servir de veículos determinando toxinfecções alimentares aos ingestores, cujos quadros nosológicos podem ser de gravidade para crianças, jovens, idosos e/ou imunossuprimidos.

Além disso, as toxinfecções alimentares causam prejuízos econômicos, devido à paralisação das atividades produtivas e/ou pelos gastos com o tratamento médico necessário e/ou pelo desperdício de alimentos.

Os alimentos de origem animal, como a carne bovina, são enquadrados como alimentos de alto risco epidemiológico. Porém, a ocorrência de D.T.A. só é possível pela ingestão de um produto contaminado, que contenha quantidade suficiente de microrganismos patogênicos.

A preparação de grande quantidade de alimentos, como ocorre em instituições de ensino na preparação da merenda escolar, implica em riscos para os estudantes (principalmente as crianças), professores e funcionários em geral, sendo de grande importância a utilização de medidas profiláticas para a diminuição deste problema, através dos aspectos higiênico-sanitários no preparo do alimento, treinamento de pessoal e a informação da educação sanitária.

A utilização de água potável dentro dos padrões de identidade e qualidade vigentes, é também essencial, para que esta não seja fonte de D.T.A. aos ingestores.

A importância dessa pesquisa, deve-se ao fato de que uma vez estabelecidos os pontos críticos no que diz respeito aos aspectos higiênico-sanitários no preparo de carne bovina nas cozinhas de instituições municipais de ensino na região metropolitana do Rio de Janeiro, serão recomendadas medidas práticas de controle.

Este trabalho irá contribuir com subsídios para fundamentar a orientação de funcionários das cozinhas de instituições municipais e estaduais de ensino, ressaltando os pontos críticos de controle, que devem ser observados durante o preparo da merenda escolar. Além disso, a realização de ciclos de palestras e/ou cursos nas instituições de ensino contribuiriam, também, para a melhoria da qualidade das refeições escolares.

Devido ao que foi referido acima, este estudo tem como objetivo geral contribuir para os órgãos de Saúde Pública, no que diz respeito às condições higiênico-sanitárias na preparação de refeições, evitando o risco de toxinfecções alimentares. Como principais objetivos específicos, tem-se: (1) avaliar as condições higiênico-sanitárias na preparação de carne bovina servida em refeições escolares (merenda escolar), em instituições municipais e estaduais de ensino, através da contagem de *Staphylococcus aureus*, número mais provável de coliformes fecais e contagem de *Clostridium perfringens*; (2) investigar as condições higiênico-sanitárias dos funcionários que manipulam alimentos e de utensílios da cozinha, por meio de *swabs* para coleta de amostras, para a contagem de *Staphylococcus aureus*, número mais provável de coliformes fecais e contagem de *Clostridium perfringens* e (3) avaliar as condições higiênico-sanitárias da água usada no abastecimento, nas instituições de ensino municipais e estaduais, conforme a portaria nº 36 de 19 de janeiro de 1990 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1990).

MATERIAL E MÉTODOS

1. Método de coleta de amostras.

Foram analisadas 110 (cento e dez) amostras, distribuídas em 22 (vinte e duas) amostras de cada um dos tipos que se segue: carne bovi-

na, servida nas refeições escolares (merenda escolar) antes da cocção; após cocção; e *swab* (zaragatoa) das mãos do funcionário responsável pela preparação da carne e utensílios de cozinha (faca de corte de carne e tábua para corte) antes do seu uso, respectivamente, em cada coleta. Sendo 48 (quarenta e oito) amostras de colégios municipais de Tanguá, estado do Rio de Janeiro; 20 (vinte) amostras de um colégio pertencente à rede estadual de ensino do Rio de Janeiro, localizado no município de Itaboraí; e 20 (vinte) amostras de um colégio localizado no município de São Gonçalo, também pertencente a rede Estadual de ensino do Rio de Janeiro (Tabela 1).

Ao mesmo tempo em que eram feitas as coletas das amostras de carne, foram coletadas amostras da água, que se utiliza no preparo das refeições, diretamente das torneiras do interior das cozinhas dos colégios, totalizando 110 (cento e dez) amostras.

Os métodos empregados foram baseados nos recomendados pela Associação Americana de Saúde Pública—"American Public Health Association"—APHA (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992).

1.1. Amostras de carne antes e após a cocção.

As amostras de carne (antes e após a cocção) foram retiradas, em condições de esterilidade, de três diferentes pontos para que se obtivesse melhor representatividade, e acondicionadas individualmente em sacos de polietileno de baixa densidade com fecho hermético, mantidas em um recipiente isotérmico, com gelo, até a chegada ao laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal, do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universi-

dade Federal Fluminense (UFF), onde foram analisadas.

Da amostra, após a homogeneização manual, foi retirada e pesada uma alíquota de 25 g diretamente em saco para *Stomacher*®, conforme normas laboratoriais, e adicionada de 225 mL de solução salina peptonada (SSP) a 0,1% e homogeneizada em *Stomacher*® por dois minutos, obtendo assim a diluição 10^{-1} . A partir desta, após homogeneização, com auxílio de uma pipeta, transferiu-se 10 mL da solução para frasco contendo 90 mL de SSP de modo a obter diluição de 10^{-2} e a partir desta diluição utilizando-se o mesmo procedimento, foi obtida a diluição de 10^{-3} .

1.2. Amostras de superfícies.

Para coleta de amostras de superfícies, foram utilizados *swabs* (zaragatoas) esterilizados que estavam contidos em tubos de ensaio contendo SSP a 0,1%. A partir desta solução executaram-se as diluições.

Os *swabs* foram friccionados nas regiões palmar, dorsal, entre dedos e leito ungueal das mãos do manipulador e nas superfícies da tábua para corte de carne, imediatamente antes da sua utilização.

O transporte dos tubos com os *swabs*, também ocorreu em recipiente isotérmico, com gelo.

Dos tubos foram retirados 10 mL da solução para frasco contendo 90 mL de SSP de modo a obter diluição de 10^{-1} e a partir desta diluição, utilizando-se o mesmo procedimento, foram obtidas as diluições de 10^{-2} e 10^{-3} .

1.3. Amostras de água de abastecimento.

Para a coleta de amostras de água de abastecimento foram utilizados frascos de vidro esterilizados, com capacidade de 250 mL com boca larga e rolha esmerilhada, adicionado de 0,02 g (ou 1 mL de solu-

ção a 2%) de tiosulfato de sódio para cada 2/3 (dois terços) do frasco (aproximadamente 170 mL). Para efeito de delineamento experimental, determinou-se que a proporção observada foi de uma análise de água para cada amostra de carne. A água foi coletada da torneira da cozinha após três minutos de escoamento, em frasco de 250 mL contendo tiosulfato de sódio, sendo transportada em recipiente isotérmico, com gelo. Após a homogeneização do conteúdo, transferiu-se com auxílio de pipeta, 1 mL da amostra para tubo de ensaio contendo 9 mL de SSP a 0,1% de modo a obter uma diluição de 10^{-1} . Em seguida, retirou-se 1 mL desta diluição 10^{-1} transferindo-a para outro tubo contendo 9 mL de SSP a 0,1%, obtendo assim a diluição de 10^{-2} . Repetiu-se o mesmo método com a diluição de 10^{-2} , obtendo-se assim a diluição de 10^{-3} .

As análises foram para enumeração de número mais provável (NMP) de coliformes total e fecal.

2. ANÁLISES LABORATORIAIS:

2.1. Enumeração de Coliformes Fecais Pelo Método do Número Mais Provável (NMP) e Identificação de *Escherichia coli*.

Seguindo-se a metodologia usada por HITCHINS et al. (1992), para cada amostra corresponderam três séries de três tubos contendo Caldo Lauril Sulfato Tryptose (LST), para os quais foi transferida uma alíquota de 1 mL, com o auxílio de uma pipeta, de cada diluição de SSP correspondente e incubados à $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}/24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$, reincubando os negativos por mais $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. A partir de cada tubo positivo de LST caracterizado pela formação de gás no interior do tubo de Durham e turvamento do meio, transferiu-se por meio de alçada, uma alíquota para três tubos correspondentes

contendo caldo para *Escherichia coli* (EC), para contagem de coliformes fecais, incubando-os em banho-maria com circulação de água à $45,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}/24 \pm 2 \text{ h}$. Os tubos positivos do caldo EC foram conferidos nas tabelas de NMP para coliformes fecais, de acordo com PEELER et al. (1992). O resultado obtido como NMP/g da amostra, permitiu avaliar a qualidade microbiológica da água, conforme os padrões estabelecidos pela portaria 451 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1998).

Dos tubos positivos do Caldo EC foram transferidas, com o auxílio de alça de platina ou de níquel cromo, alíquotas que através de estrias foram inoculadas, por esgotamento, em placas correspondentes

contendo meio Ágar Eosina Azul de Metileno, segundo Levine (EMB), incubadas à $35^{\circ}\text{C}/24 \pm 2 \text{ h}$. Ao ocorrer crescimento de UFC típicas, nucleadas com centro negro e brilho verde metálico, estas foram transferidas de três a cinco unidades de cada placa por meio de agulha para o meio Ágar Padrão para Contagem (PCA), inclinado em tubo, à $35^{\circ}\text{C}/18-24 \text{ h}$. Na ausência de UFC típicas, porém semelhantes, também foi feita a repicagem para o PCA. Terminada a incubação, transferiu-se alíquotas por meio de alçada para meios adequados à realização das provas bioquímicas para a caracterização da *E. coli*.

Foram realizados os seguintes testes bioquímicos complementares: Indol; Voges-Proskauer (VP);

TABELA 1 Identificação das amostras com seus respectivos locais de coleta e data, assim como seu respectivo cardápio oferecido na merenda escolar.

AMOSTRA	LOCAL	CARDÁPIO	DATA
1	EMVMNS*	Cachorro-quente	11.08.99
2	EMPDSM*	Sopa (legumes e carne)	11.08.99
3	EMVMNS	Carne seca com abóbora	18.08.99
4	EMPDSM	Cachorro-quente	18.08.99
5	EMVMNS	Sopa de macarrão com carne	24.08.99
6	EMPDSM	Sopa (legumes e carne)	24.08.99
7	EMVMNS	Cachorro-quente	31.08.99
8	CESD*	Sopa (legumes e carne)	08.09.99
9	CESD	Macarrão com salsicha	14.09.99
10	CEHAP*	Carne seca com abóbora	04.10.99
11	CEHAP	Sopa (legumes e carne)	20.10.99
12	CESD	Macarrão com carne moída	04.11.99
13	CESD	Carne seca com abóbora	22.11.99
14	CEHAP	Carne seca com abóbora	24.11.99
15	CEHAP	Carne picada com vagem	25.11.99
16	EMPDSM	Macarrão com carne moída	25.11.99
17	EMPDSM	Cachorro-quente	26.11.99
18	CESD	Carne com batata	07.12.99
19	EMVMNS	Cachorro-quente	08.12.99
20	EMPDSM	Sopa (legumes e carne)	09.12.99
21	CEHAP	Carne ensopada	13.12.99
22	EMVMNS	Carne ensopada	15.12.99

* Escola Municipal Vereador Manoel Novis da Silva (Tanguá-RJ).

+ Escola Municipal Professora Dearina Silva Machado (Tanguá-RJ).

* Colégio Estadual Santos Dias (São Gonçalo-RJ).

* Colégio Estadual Hilka de Araújo Peçanha (Itaboraí-RJ).

vermelho de metila (VM); citrato de Simmons; coloração pelo método de Gram; testes de produção de gás a partir da glicose, H_2S , urease e triptofano desaminase (meio EPM) e testes de motilidade, indol e lisina (meio MILi).

Durante os testes adicionais para a identificação bioquímica da *Escherichia coli*, utilizou-se uma cepa padrão de *E. coli* O157:H7 PHLS ("Public Health Laboratory Service") E-40705, pertencente ao Laboratório de Microbiologia de

Alimentos da Faculdade de Veterinária (UFF).

2.2. Contagem de *Staphylococcus aureus*.

O método descrito a seguir é baseado em LANCETTE & TATINI (1992). De cada diluição inicial retira-se, com o auxílio de uma pipeta, uma alíquota de 1 mL que é distribuída na placa pelo método *spread plate*, usando o bastão de vidro (*Drigalsky*), em três placas, respectivamente (0,4; 0,3 e 0,3 mL), contendo o meio seletivo indicador Ágar Baird Parker (ABP), incubadas à 35°C-37°C/46 h + 2 h após a absorção da amostra pelo meio.

Porém, para praticidade, agilidade e economia, nas análises laboratoriais, o *spread plate* foi feito em apenas duas placas contendo ABP, sendo uma com 0,2 mL e outra com 0,3 mL de cada diluição. Para a contagem, foram feitos os cálculos normais, sendo o resultado final multiplicado por dois.

Duas ou mais UFC características, isto é, de no máximo 1,5 mm, cor negra ou cinza escuro, lisas, convexas, podendo apresentar zona opaca e/ou halo claro em torno, foram selecionadas de placas com ABP, contendo entre 20 e 200 UFC.

TABELA 2 Resultados da determinação do Número Mais Provável (NMP/mL) de Coliformes Totais e Fecais de amostras de água de abastecimento das instituições de ensino que foram analisadas.

AMOSTRA DE ÁGUA	Coliformes Totais (NMP/mL)	Coliformes Fecais (NMP/mL)
1	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
2	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
3	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
4	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
5	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
6	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
7	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
8	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
9	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
11	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
12	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
13	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
14	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
15	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
16	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
17	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
18	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
19	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
20	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
21	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
22	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10

TABELA 3 Relação das amostras onde ocorreram Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Fecais com a percentagem de UFC identificadas bioquimicamente como *Escherichia coli*.

AMOSTRAS	CARNE CRUA			SWAB DE MÃOS		
	Coliformes Fecais	<i>Escherichia coli</i> (%)		Coliformes Fecais	<i>Escherichia coli</i> (%)	
	NMP/g	+	-	NMP/g	+	-
2	2,3 x 10	0%	100%	---	---	---
3	---	---	---	7,5 x 10	0%	100%
4	---	---	---	0,4 x 10	0%	100%
5	4,6 x 10 ²	83,3%	16,7%	---	---	---
15	0,9 x 10	0%	100%	---	---	---
16	7,5 x 10	0%	100%	---	---	---
18	9,3 x 10	60%	40%	---	---	---
20	1,5 x 10 ²	0%	100%	---	---	---
21	1,1 x 10 ³	62,5%	37,5%	---	---	---
22	> 1,1 x 10 ³	100%	0%	---	---	---

TABELA 4 Resultado da determinação do Número Mais Provável (NMP/g) de Coliformes Fecais das amostras de carne crua (CR), carne cozida (CZ), swab de mãos (SM) e swab de utensílio (SU).

AMOSTRA	Coliformes Fecais (NMP/g)			
	CR	CZ	SM	SU
1	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
2	2,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
3	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	7,5 x 10	< 0,3 x 10
4	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	0,4 x 10	< 0,3 x 10
5	4,6 x 10 ²	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
6	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
7	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
8	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
9	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
11	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
12	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
13	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
14	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
15	0,9 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
16	7,5 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
17	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
18	9,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
19	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
20	1,5 x 10 ²	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
21	1,1 x 10 ³	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
22	> 1,1 x 10 ³	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10

A UFC do *S. aureus* apresenta-se com estas características pois, ao crescer, reduz o telurito de potássio à telurito metálico e hidrolisa a lipovitellina, que é uma lipoproteína, encontrada na gema do ovo. O halo opaco aparece devido ao precipitado de carbonato de cálcio.

As UFC selecionadas foram inoculadas em tubos correspondentes, contendo cerca de 2 mL de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) e após homogeneização cuidadosa foi alçada uma alíquota para o meio inclinado de Trypticase de Soja (TS) ou Ágar Nutriente (AN), incubando os dois meios à 35°C-37°C/18-24 h.

Para o teste da coagulase, transferiu-se 0,2 mL de cada tubo de BHI para tubos de 10 x 100 mm e adicionou-se 0,2 mL de plasma de coelho. Incubou-se em banho-maria à 35°C-37°C e, logo depois observou-se a formação de coágulo nas pri-

meiras 6 h, de hora em hora. Reações de nível 3 e 4 são confirmativas para *S. aureus* devendo as de níveis 1 e 2 serem submetidas a testes adicionais.

O resultado foi expresso em UFC/g em função da diluição, do número de UFC típicas contadas e o percentual de confirmadas.

Foram efetuados os seguintes testes adicionais: coloração pelo método de Gram; catalase; DNase; oxidação e fermentação de glicose e manitol; termonuclease e Voges-Proskauer (VP).

Durante os testes adicionais para a confirmação bioquímica da presença do *Staphylococcus aureus*, utilizou-se uma cepa padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC ("American Type Culture Collection") 25923, pertencente ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária (UFF).

2.3. Contagem de *Clostridium perfringens*.

O método de identificação para o *C. perfringens*, foi baseado em LABBE & HARMON (1992). A partir do SSP, correspondente, inoculou-se 1 mL, com pipeta, em placas (10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³), respectivamente. Verteceu-se nas placas inoculadas, cerca de 5,0 a 15,0 mL de Ágar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS), previamente fundidos e resfriados à 45°C, mantidos em banho-maria, até o momento do seu uso (técnica *pour plate*). Misturou-se o inóculo com o SPS movimentando-se suavemente as placas, numa superfície plana, em movimentos na forma de oito ou círculo, de 8 a 10 vezes no sentido horário e de 8 a 10 vezes no sentido anti-horário. Esperou-se a solidificação do meio e depois adicionou-se mais uma camada de SPS (técnica da *dupla camada* ou *sobrecamada*). Incubou-se as placas em atmosfera de anaerobiose à 46°C/24 h, segundo a portaria 451 (BRASIL, 1998). A atmosfera de anaerobiose foi feita no interior da Jarra de Anaerobiose, utilizando-se de: 5 g de palha de aço; 75 mL de solução Acidulada de Sulfato de Cobre 5%; dois comprimidos de Sonrisal® (8,0 g); papel indicador; Becher de 250 mL; 75 mL de H₂O destilada e placas de Petri vazias (JÜRGENSEN, 1981).

Mesmo sendo recomendado por LABBE & HARMON (*ibid.*), o uso de Ágar Triptose Sulfito Cicloserina (TSC), com ou sem adição de gema de ovo, usou-se no lugar dele, o SPS, pois além da sua praticidade ser citada por outras literaturas internacionais, SILVA *et al.* (1997), descrevem que o SPS não permite o crescimento e produção de toxina de *Clostridium botulinum*, garantindo a segurança do analista e do laboratório.

Para a contagem de placas padroniza-se a escolha de placas que contenham de 20 a 200 UFC negras, pois os clostrídios reduzem sulfito

GRÁFICO 1 Relação das amostras contaminadas com Coliformes Fecais usando a técnica do Número Mais Provável (NMP/g) e percentagem de UFC identificadas como *Escherichia coli*.

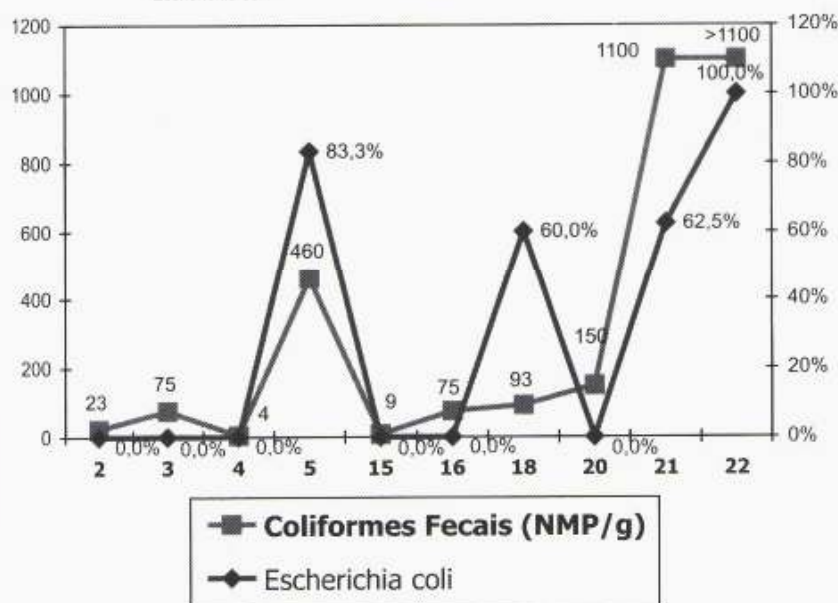
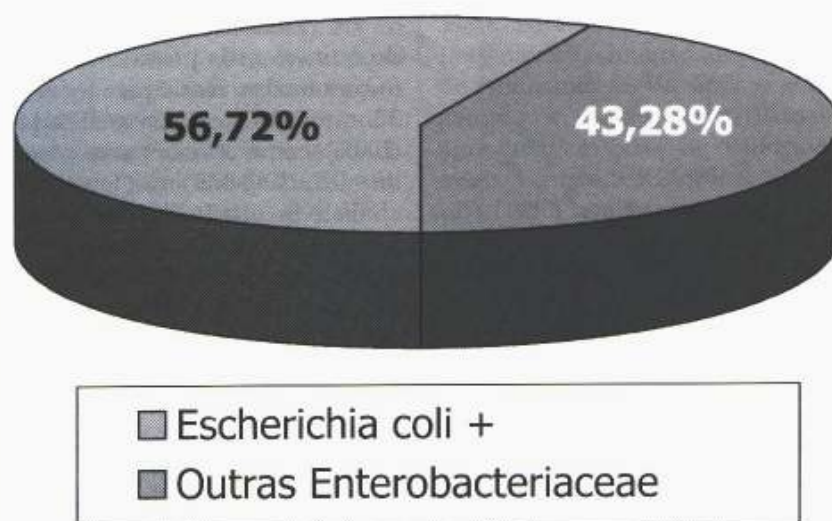


GRÁFICO 2 Percentagem dos resultados da identificação bioquímica de *Escherichia coli*, sugerindo 56,72% de *E. coli* positivas versus 43,28% de outras *Enterobacteriaceae*.



a sulfeto, que reage com o ferro e precipita-se na forma de sulfeto de ferro, dando uma coloração negra às UFC de *C. perfringens*. Porém não houve crescimento nas placas de

SPS. Pelo fato de não ter ocorrido a presença de *Clostridium perfringens* nas amostras analisadas, a contagem, o cálculo dos resultados e os testes confirmativos que se encon-

tram discriminados a seguir, não foram procedidas.

Caso ocorresse crescimento de *C. perfringens*, seriam selecionadas cinco UFC típicas e transferidas para meio de Tioglicolato. Incubadas à 35°C-37°C/24 h e inocular-se-ia a cultura obtida nos meios usados para os testes confirmativos.

Seriam usados os seguintes testes confirmativos: fermentação da lactose e hidrólise da gelatina; coagulação tempestuosa do leite; redução do nitrato e motilidade; fermentação da rafinose e salicina.

O resultado seria expresso através do cálculo do número de UFC/g em função do número de UFC típicas, diluição inoculada e percentagem de UFC confirmadas.

2.4. Análise da Água de Abastecimento.

Para a determinação do NMP de coliformes totais, seguiu-se a metodologia descrita para *E. coli* de HITCHINS *et al.* (1992), a partir dos tubos positivos de LST transferiu-se alíquotas de 1 mL para cada três tubos correspondentes contendo Caldo Verde Brilhante Bile (VBBL), incubou-se à 35°C-37°C/24-48 h. Dos tubos positivos foi consultada a tabela para NMP de acordo com PEELER *et al.* (1992).

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Neste estudo utilizou-se o coeficiente de correlação e a covariância para verificar o grau de dependência entre os valores encontrados nas amostras analisadas, principalmente entre as amostras de carne crua e carne cozida.

Segundo BERQUÓ *et al.* (1981), em pesquisas que envolvem a consideração de duas ou mais variáveis, estas são estudadas simultaneamente, procurando-se uma possível correlação entre elas, isto é, quer-se saber se as alterações sofridas por uma das variáveis são acom-

GRÁFICO 3 Percentagem das interpretações e conclusões das análises microbiológicas das amostras de carne crua analisadas, em relação ao Número Mais Provável (NMP/g) de Coliformes Fecais.

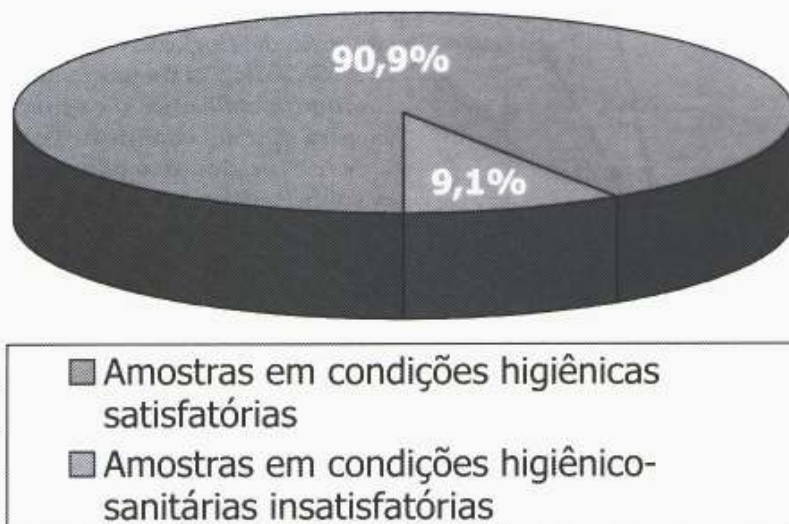
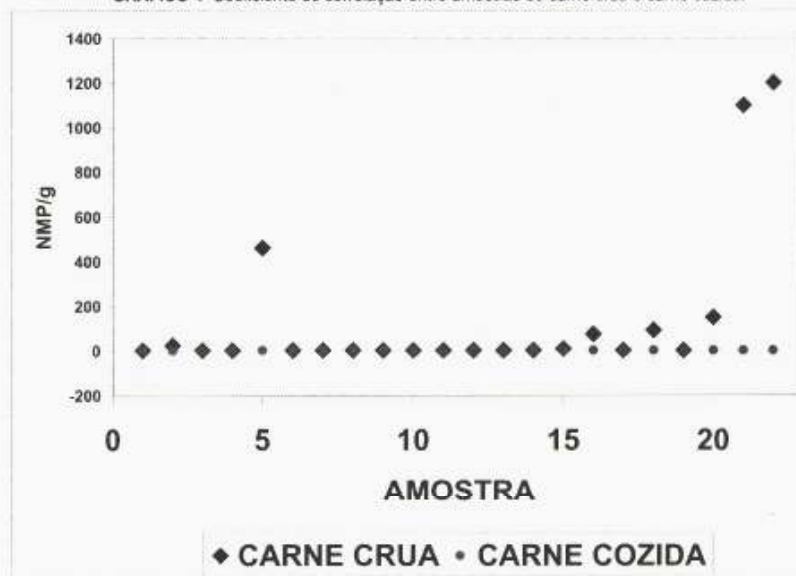


GRÁFICO 4 Coeficiente de correlação entre amostras de carne crua e carne cozida.



panhadas por alterações nas outras. No caso particular de duas variáveis X e Y, procura-se verificar se os aumentos (ou diminuições) em X, correspondem a aumentos (ou diminuições) em Y, ou se aumentos (ou diminuições) em X são acom-

panhados de diminuições (ou aumentos) em Y ou, finalmente, se os aumentos (ou diminuições) em X não estão relacionados com as alterações em Y.

No caso de X e Y apresentarem variações em um mesmo sentido,

diz-se que entre elas existe correlação positiva; quando as variações de X e Y são em sentidos contrários, trata-se de correlação negativa; finalmente, quando a variação de X não está relacionada com a variação de Y, é o caso de não haver correlação (VIEIRA, 1981; BERQUÓ *et al.*, 1981).

De especial importância para o estudo da correlação entre duas variáveis é a covariância, que mede a variação concomitantemente dessas variáveis. No caso de uma correlação positiva, a covariância apresentará um sinal positivo; na correlação negativa, a covariância também será negativa; e no caso de não existir uma correlação, a covariância é nula (BERQUÓ *et al.*, 1981).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As técnicas microbiológicas utilizadas na pesquisa permitiram avaliar diferentes características associadas à microbiota bacteriana presente na carne crua, carne cozida, mãos de manipuladores e utensílios.

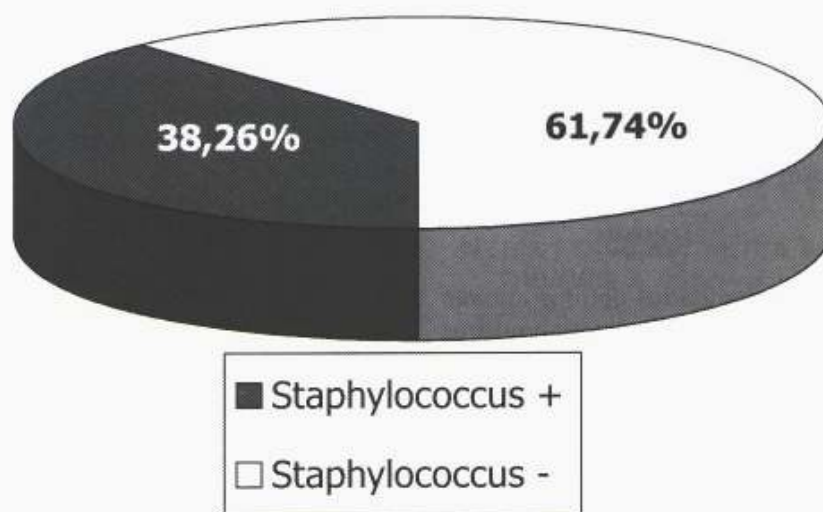
Os resultados da determinação do número mais provável de coliformes totais e fecais para todas as 22 amostras de água analisadas (100%) sempre apresentaram valores de $< 0,3 \times 10^1$ NMP/mL (Tabela 2).

Este resultado deve-se principalmente pelo fato da água ser fornecida pela Companhia Estadual de Água e Esgoto do Rio de Janeiro (CEDAE-RJ), além do uso de pastilhas de Cloro nas cisternas e caixas d'água das instituições de ensino.

O Gráfico 1 demonstra a relação das amostras com as estimativas do Número Mais Provável (NMP/g) de coliformes fecais e a percentagem de UFC identificadas como *Escherichia coli* através das provas bioquímicas, em conformidade com a Tabela 3.

Das 67 (100%) UFC isoladas para as provas bioquímicas de iden-

GRÁFICO 5 Percentagem dos resultados da identificação bioquímica de *Staphylococcus* sugerindo 38,26% de *Staphylococcus* positivas versus 61,74% que não foram identificadas como tais.



tificação de *Escherichia coli*, 38 (56,72%) sugeriram positividade para esta espécie (Gráfico 2).

Das 22 (100%) amostras de carne crua, oito (36,36%) apresentaram um número mais provável de coliformes fecais (Tabela 4), sendo que destas oito amostras, duas (25%) apresentaram uma contagem de NMP acima de 10^3 /g, estando fora dos padrões, de acordo com a consulta pública nº 5 de 21 de outubro de 1999 (BRASIL, 1999), ainda não se encontrando em vigor.

Ainda de acordo com a consulta pública nº 5 (*ibid.*), das 22 (100%) amostras de carne crua analisadas, 20 (90,9%) atenderam aos limites estabelecidos, sendo classificadas como produtos em condições higiênicas satisfatórias, enquanto que apenas duas (9,1%) apresentaram coliformes fecais, classificando-se como produtos em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias (Gráfico 3), entretanto, a legislação em vigor, portaria 451 (BRASIL, 1998), não estabelece padrões de identidade e finalidade para o alimento mencionado.

LEITE *et al.* (1988), publicaram que 56% das amostras de produtos cárneos crus apresentavam um número mais provável de coliformes fecais fora dos padrões brasileiros. Porém, é importante ressaltar, que as amostras de carne crua que apresentaram número mais provável de coliformes fecais, após o cozimento (cocção) adequado não mais apresentavam NMP de coliformes fecais. De fato, CREMER & CHIPLEY (1980), avaliaram fases de cocção de carne (antes e após a cocção), confirmando que a cocção adequada é de extrema importância para a extinção dos coliformes fecais do alimento.

Não houve correlação entre a carne crua e a carne cozida, pois o coeficiente de correlação foi nulo ($r=0$). A covariância também foi nula, demonstrando, assim, que ocorreu uma independência entre as variáveis carne crua e carne cozida (Gráfico 4), comprovando a importância da cocção na diminuição da carga bacteriana.

Na presente pesquisa, duas (9,1%) amostras de *swab* de mãos

apresentaram número mais provável de coliformes fecais (Tabela 4). Não houve detecção de coliformes fecais, *S. aureus* e *C. perfringens* em *swab* de utensílios. Entretanto, SILVA JR. & MARTINS (1991), analisaram microbiologicamente 66 panelas, sendo que em 12 (18%) foram isoladas *E. coli* e em três (4,5%), *S. aureus*. Além disso, BRYAN & MCKINLEY (1979), isolaram *C. perfringens* de carne crua (60%), equipamentos (8%) e carne cozida (5%) e *S. aureus* de carne crua (47%), equipamentos (9%), manipuladores (100%) e carne cozida (16%).

Com base na característica morfotintorial (cocos Gram +) e características fenotípicas (catalase positiva, oxidação e fermentação da glicose e manitol), sugere-se que das 115 (100%) UFC isoladas, 44 (38,26%) pertenciam ao gênero *Staphylococcus* (Gráfico 5).

Mesmo com a realização das provas DNase, termonuclease, VP e coagulase, não foi possível caracterizar a espécie *Staphylococcus aureus*, através das combinações das provas realizadas.

Do total de 88 amostras, distribuídas em 22 amostras de igual número de carne crua; carne cozida; *swab* de mão e *swab* de utensílio, 100% apresentaram ausência de *Staphylococcus aureus*.

Não foi detectada a presença de *Clostridium perfringens* em nenhuma das amostras analisadas (carne crua, carne cozida, *swab* de mãos e *swab* de utensílios).

Através destes resultados, ficou clara a importância de se conhecer os principais fatores que contribuem para que ocorra a contaminação nos alimentos e conseqüentemente o risco de ocorrer Doenças Transmitidas por Alimentos (D.T.A.), como cozimento inadequado, más condições das cozinhas, incorreta manipulação e principalmente uma pobre higiene pessoal. Tal como descreve MARTIN (1985), os principais fatores que contribuem para o apareci-

mento de surtos de toxinfecção alimentar são cozimento inadequado, uso de alimento de fonte insegura e higiene pessoal deficiente. O que também foi corroborado por REIS JR. & BRANDÃO (1996), onde mostraram que 75% dos casos de toxinfecções se deve às más condições de cozinhas industriais, restaurantes, hospitais, etc, e cerca de 20% à incorreta manipulação em cozinhas domésticas, os outros 5% deve-se às condições inadequadas de produção na própria indústria. Além disso, SILVA & SERAFINI (1997), afirmam que os alimentos só se tornam perigosos após terem sido violados os princípios de higiene, ou então a permanência destes em condições que possam permitir a contaminação e/ou a multiplicação de microrganismos patogênicos.

Embora a portaria 451 de 19 de setembro de 1997, não estabeleça padrão de identidade e qualidade para a presença de Coliformes Fecais e *Escherichia coli* nos alimentos analisados nesta pesquisa, os valores encontrados para o microrganismo em questão sugeriram que estes não foram determinadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (D.T.A.), pois os seus ingestores não apresentaram nenhuma queixa nosológica, podendo até serem considerados como participantes da prova biológica.

Espera-se que os resultados obtidos neste trabalho possam servir de auxílio para o aprimoramento destes padrões microbiológicos, uma vez que a consulta pública nº 5 de 21 de outubro de 1999, estabelece para Coliformes Fecais o número máximo de 10^3 /g para cada amostra de carne crua (BRASIL, 1999).

Não devemos nos esquecer que a negligência e/ou o desinteresse, ou mesmo a simples desinformação são os principais responsáveis pela ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos (D.T.A.), conseqüentemente se faz necessário fornecer subsídios para que todos os profissio-

nais da área de produção e manipulação de alimentos em cozinhas industriais (escolas, creches, hospitais, quartéis, asilos, etc.), sejam informados sobre os principais fatores de risco de contaminação dos alimentos e, principalmente, reconheçam a importância da higiene na preparação destes alimentos, evitando-se assim as principais D.T.A.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através das análises realizadas nas amostras provenientes das instituições de ensino, mostraram que as condições higiênico-sanitárias na preparação de carne bovina servida em refeições escolares (merenda escolar) são satisfatórias, pois apenas duas (9,1%) amostras de carne crua encontraram-se acima dos padrões, porém a cocção adequada extinguiu esta contaminação.

As condições higiênico-sanitárias dos funcionários que manipulam alimentos e dos utensílios da cozinha são satisfatórias, não demonstrando comprometimento microbiológico quanto à manipulação e preparo dos alimentos.

As condições higiênico-sanitárias da água de abastecimento nas instituições de ensino municipais e estaduais, encontram-se dentro das normas e padrões de potabilidade da água destinada ao consumo humano de acordo com a portaria nº 36 de 19 de janeiro de 1990 (BRASIL, 1990).

Nem sempre as UFC características de *Escherichia coli*, com ou sem brilho verde metálico no meio EMB, apresentaram-se como positivas para este microrganismo, nas provas bioquímicas realizadas.

Em nenhuma das amostras analisadas foi detectada a presença de *Clostridium perfringens*.

O meio de plaqueamento seletivo/indicador para *Staphylococcus aureus* (meio ABP), apesar de indicar a presença de UFC típicas, estas não apresentaram característi-

cas bioquímicas para este microrganismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERQUÓ, E. S.; SOUZA, J. M. P. & GOTLIEB, S. L. D. *Bioestatística*. 2ª edição. São Paulo : Editora Pedagógica e Universitária. 1981, 350 p.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. MS/SVS. Consulta Pública nº 5 de 21 de outubro de 1999. Propõe o Regulamento Técnico para Princípios Gerais para o Estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial*. Brasília. 28 de outubro de 1999, p. 42-53.
- _____. Gabinete do Ministro. Ministério da Saúde. GM/MS. Portaria nº 36 de 19 de janeiro de 1990. Aprova Normas e Padrão de Potabilidade da Água Destinada ao Consumo Humano. *Diário Oficial*. Brasília. 23 de janeiro de 1990, p. 1651-1654.
- _____. Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. MS/SVS. Portaria nº 451 de 19 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico Princípios Gerais para o Estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos. Republicada por ter saído com incorreção, no D.O. nº 182, de 22/09/97, Seção 1, p. 21.005-21.012. *Diário Oficial*. Brasília. 02 de julho de 1998, p. 4-13.
- BRYAN, F. L. & MCKINLEY, T. W. Hazard analysis and control of roasts beef preparation in foodservice establishments. *Journal of Food Protection*. Vol. 42, n. 1. January. 1979, p. 4-18.
- CREMER, M. L. & CHIPLEY, J. R. Time and temperature, microbiological, and sensory assessment of roast beef in hospital foodservice system. *Journal of Food Science*. Vol. 45. 1980, p. 1472-1477.
- HITCHINS, A. D.; HARTMAN, P. A. & TODD, E. C. D. Coliforms - *Escherichia coli* and its toxins. Cap. 24, p. 325-369. In : VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D. F.

- Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods, 3rd edition. Washington : American Public Health Association (APHA). 1992, 1912 p.
- JÜRGENSEN, C. A. Caracterização preliminar ao nível de Gênero para bactérias anaeróbias predominantes em material clínico. Revista Brasileira de Patologia Clínica. Vol. 17, n. 3. 1981, p. 74-77.
- LABBE, R. G. & HARMON, S. M. Clostridium perfringens. Cap. 37, p. 623-635. In : VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D. F. Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods, 3rd edition. Washington : American Public Health Association (APHA). 1992, 1912 p.
- LANCETTE, G. A. & TATINI, S. R. Staphylococcus aureus. Cap. 33, p. 533-550. In : VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D. F. Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods, 3rd edition. Washington :
- American Public Health Association (APHA). 1992, 1912 p.
- LEITE, C. Q. F.; VALENTINI, S. R. & FALCÃO, D. Pesquisa de enteropatógenos em alimentos cárneos crus. Ciência Tecnologia de Alimentos. Vol. 08, n. 02. Julho. 1988, p. 155-168.
- MARTH, E. H. Public health and regulatory concerns of the foodservice industry. Dairy Food Sanitation. Vol. 05, n. 08. August. 1985, p. 292-297.
- PEELER, J. T.; HOUGHTBY, G. A. & RAINOSEK, A. P. The most probable number technique. Cap. 6, p. 105-120. In : VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D. F. Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods, 3rd edition. Washington : American Public Health Association (APHA). 1992, 1912 p.
- REIS Jr., J. S. & BRANDÃO, S. C. C. Fiscalização de alimentos de origem animal: custos e benefícios. Higiene Alimentar. Vol. 10, n. 41. Janeiro/ Fevereiro. 1996, p. 05-06.
- SILVA, C. A. & SERAFINI, A. B. Análise microbiológica das refeições servidas no restaurante da Universidade Federal de Goiás, entre junho e novembro de 1994. Higiene Alimentar. Vol. 11, n. 48. Março/ Abril. 1997, p. 26-29.
- SILVA Jr., E. A. & MARTINS, E. A. Análise microbiológica em cozinhas industriais. Higiene Alimentar. Vol. 05, n. 17. Março. 1991, p. 20-24.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A. & SILVEIRA, N. F. A. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. São Paulo : Livraria Varela. 1997, 295 p.
- VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D. F. Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods, 3rd edition. Washington : American Public Health Association (APHA). 1992, 1912 p.
- VIEIRA, S. Introdução à Bioestatística. Rio de Janeiro : Editora Campus. 1981, 294 p. ♦

Leia e assine a Revista Higiene Alimentar

UMA PUBLICAÇÃO DEDICADA
AOS PROFISSIONAIS E EMPRESÁRIOS
DA ÁREA DE ALIMENTOS

Indexada em três Bases de Dados:

CAB ABSTRACTS (Inglaterra)
LILACS-BIREME (Brasil)
PERI-ESALQ-USP (Brasil)

Redação:

Rua das Gardêneas, nº 36 - Mirandópolis
CEP 04047- 010 - São Paulo - SP
Tel.: 11 5589-5732 — Fax: 11 5583-1016

