

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Catierine Hirsch Werle

**Avaliação das condições higiênico-sanitárias da alimentação
servida às crianças em escolas do município de São José do
Rio Preto - SP**

São José do Rio Preto - SP

2011

**Avaliação das condições higiênico-sanitárias da alimentação
servida às crianças em escolas do município de São José do
Rio Preto - SP**

Orientador: Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José
do Rio Preto - SP para obtenção do título de mestre em
Engenharia e Ciência de Alimentos, área de
concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos, linha
de pesquisa: Microbiologia e Bioprocessos.

São José do Rio Preto - SP

2011

Werle, Catierine Hirsch.

Avaliação das condições higiênico-sanitárias da alimentação servida às crianças em escolas do município de São José do Rio Preto - SP / Catierine Hirsch Werle. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.

90 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Fernando Leite Hoffmann

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de

Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia sanitária. 2. Alimentos – Microbiologia. 3. Merenda escolar – São José do Rio Preto (SP). 4. Higiene alimentar. I. Hoffmann, Fernando Leite. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 579.63

CATIERINE HIRSCH WERLE

**Avaliação das condições higiênico-sanitárias da alimentação
servida às crianças em escolas do município de São José do
Rio Preto - SP**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos junto ao programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto - SP.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann
Universidade Estadual Paulista - UNESP
Membro titular da banca

Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Membro titular da banca

Profa. Dra. Maria Luiza Silva Fazio
Universidade do Instituto Municipal de Ensino Superior
Membro titular da banca

São José do Rio Preto – SP
2011

*“A gente pode morar numa casa mais ou menos, numa rua mais ou menos, numa cidade mais ou menos, e até ter um governo mais ou menos. A gente pode dormir numa cama mais ou menos, comer um feijão mais ou menos, ter um transporte mais ou menos, e até ser obrigado a acreditar mais ou menos no futuro.
A gente pode olhar em volta e sentir que tudo está mais ou menos...”*

TUDO BEM!

O que a gente não pode mesmo, nunca, de jeito nenhum... é amar mais ou menos, sonhar mais ou menos, ser amigo mais ou menos, namorar mais ou menos, ter fé mais ou menos, e acreditar mais ou menos. Senão a gente corre o risco de se tornar uma pessoa mais ou menos.”

Chico Xavier

A Deus

“Quando tudo parece se fechar, Deus abre uma nova porta, quando você diz: não vou conseguir, Deus diz: não temas pois estou contigo” Obrigada pelas bênçãos concedidas, pelas pessoas maravilhosas que cruzaram meu caminho e pela certeza de nunca estar sozinha.

Aos meus pais Genésio e Jeani

A minha irmã Tatiane

Ao meu afilhado Nicolás

A toda minha família

Que tanto amo e sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida, e souberam entender os meus momentos de ausência, correria, estresse e mau humor estando sempre ao meu lado, a vocês dedico este trabalho.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de São José do Rio Preto - SP.

Agradecimentos

Agradeço especialmente ao Prof. Dr Fernando Leite Hoffmann pela orientação, pelo incentivo, motivação e exemplo de vida e superação. Pelo tempo e atenção dispensados desde a escolha do projeto até as etapas finais de conclusão. Obrigada também pela paciência e por todo conhecimento e amadurecimento científico. Ao senhor meu carinho, reconhecimento e minha mais sincera gratidão.

Aos integrantes da banca examinadora Dra Margarete Teresa Gottardo, Dra Maria Luíza Fazio, Dr Roberto da Silva e Dr Alexandre Rodrigo Coelho pela disponibilidade, e pelas críticas e sugestões que muito contribuíram para este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio financeiro

As escolas, diretores, responsáveis e manipuladores pela colaboração e boa vontade para realização deste trabalho.

A Tânia, que sempre esteve presente quando mais precisei, com sua boa vontade, simpatia, carisma, sempre tornando tudo muito mais fácil. Obrigada Taninha, você é muito especial!

Aos meus colegas de laboratório Ana Paula, Catharina, Marília, Juliano, Jeferson, muito obrigada pelo apoio e por sempre estarem presentes nas horas em que precisei, e também por tornarem tudo mais divertido.

A Jaqueline, Jaque muito obrigada por toda sua ajuda, por ter dispensado seu tempo com minhas análises e também por tornar tudo muito mais agradável.

A todos meus colegas na pós-graduação, especialmente Camila, Cristiane, Elaine Juliane, Jaqueline, Patrícia, meninas muito obrigada por tudo, vocês fizeram com que o esse desafio fosse muito mais fácil.

A Jaqueline do Adolfo Lutz, pelo conhecimento e esclarecimento de muitas dúvidas com a microbiologia de alimentos. Muito obrigada pela sua ajuda.

A Professora Dra Margarete e todo pessoal da Famerp pela ajuda e apoio científico e pela oportunidade de realizar algumas análises.

Aos professores do curso de pós-graduação pelos ensinamentos transmitidos no decorrer do curso, principalmente a Prof. Dra. Eleni Gomes, por todo conhecimento em Microbiologia.

A minha tia Marcia, minhas avós Selita e Nilda por todo apoio carinho e compreensão.

Ao meu avô Plínio que tenho certeza que onde ele estiver está sempre torcendo por mim.

A Sucilene, uma pessoa especial que sempre acreditou em mim e me apoiou em todas minhas decisões e conquistas.

Aos meus familiares pelo apoio e incentivo, pelos valores morais e pelo exemplo. Obrigada por acreditarem em mim.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho

Sinceramente Obrigada!

SUMÁRIO

| | |
|--|--------------|
| LISTA DE TABELAS | xiv |
| LISTA DE GRÁFICOS | xvi |
| RESUMO | xvii |
| ABSTRACT | xviii |
| 1.0 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA | 1 |
| 2.0 OBJETIVOS | 3 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 3 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 3 |
| 3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 3.1 Merenda escolar..... | 4 |
| 3.2 Doenças transmitidas por alimentos (DTAs)..... | 5 |
| 3.2.1 Manipuladores de alimentos..... | 6 |
| 3.3 Avaliação da qualidade microbiológica..... | 6 |
| 3.3.1 Bactérias do grupo coliforme..... | 6 |
| 3.3.1.1 Coliformes totais..... | 6 |
| 3.3.1.2 Coliformes termotolerantes..... | 7 |
| 3.3.1.3 <i>Escherichia coli</i> | 8 |
| 3.3.2 <i>Staphylococcus spp</i> | 8 |
| 3.3.3 Gênero <i>Salmonella</i> | 10 |
| 3.3.4 <i>Bacillus cereus</i> | 11 |
| 3.3.5 Clostrídios sulfito redutores..... | 12 |
| 3.3.6 Bactérias heterotróficas..... | 13 |
| 3.3.7 Fungos filamentosos e leveduras..... | 13 |
| 3.4 Água..... | 14 |
| 3.5 Resistência aos antimicrobianos..... | 15 |
| 4.0 MATERIAIS E MÉTODOS | 17 |
| 4.1 Obtenção das amostras..... | 17 |
| 4.1.1 Merenda escolar..... | 17 |
| 4.1.2 Água..... | 18 |
| 4.1.3” Swab” de mão | 18 |
| 4.2 Preparo das amostras..... | 19 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2.1 Merenda escolar..... | 19 |
| 4.2.2 Água..... | 19 |
| 4.2.3 “Swab” | 20 |
| 4.3 Determinação do NMP de coliformes totais..... | 20 |
| 4.4 Determinação do NMP de coliformes termotolerantes..... | 21 |
| 4.5 Pesquisa de <i>E. coli</i> | 21 |
| 4.6 Contagem de Heterotróficos..... | 21 |
| 4.7 Contagem de bolores e leveduras..... | 22 |
| 4.8 Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva..... | 22 |
| 4.9 Pesquisa de <i>Salmonella spp.</i> | 23 |
| 4.10 Contagem de <i>Bacillus cereus</i> | 24 |
| 4.11 Contagem de Clostrídios sulfito redutores..... | 25 |
| 4.12 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos..... | 25 |
| 4.13 Aplicação do Check List..... | 26 |
| 5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 27 |
| 5.1 Coliformes totais..... | 27 |
| 5.2 Coliformes termotolerantes..... | 31 |
| 5.3 Pesquisa de <i>E. coli</i> | 35 |
| 5.4 Bolores e leveduras..... | 37 |
| 5.5 <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva..... | 41 |
| 5.6 <i>Salmonella spp.</i> | 46 |
| 5.7 <i>Bacillus cereus</i> | 47 |
| 5.8 Clostrídios sulfito redutores..... | 51 |
| 5.9 Análise de água..... | 53 |
| 5.10 “Swab” de mão..... | 57 |
| 5.11 Check List | 64 |
| 5.11.1 Aspectos Gerais de Recursos Humanos..... | 64 |
| 5.11.2 Aspectos gerais de condições ambientais..... | 66 |
| 5.11.3 Aspectos gerais de instalações, edificações e saneamento..... | 67 |
| 5.11.4 Aspectos gerais dos equipamentos..... | 69 |
| 5.11.5 Aspectos gerais de sanitização..... | 71 |
| 5.11.6 Aspectos gerais de produção..... | 73 |
| 5.12 Susceptibilidade aos antimicrobianos..... | 76 |

| | |
|--|-----------|
| 5.12.1 Cepas de <i>E.coli</i> | 76 |
| 5.12.2 Cepas de <i>S. aureus</i> | 77 |
| 6.0 CONCLUSÕES..... | 80 |
| 7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 81 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Resultados obtidos após determinação do NMP/g de coliformes totais na escola I. | 28 |
| Tabela 2. Resultados obtidos após determinação do NMP/g de coliformes totais na escola II..... | 29 |
| Tabela 3. Resultados obtidos após determinação do NMP/g de coliformes totais na escola III..... | 30 |
| Tabela 4. Resultados obtidos após determinação do NMP/g de coliformes termotolerantes na escola I..... | 32 |
| Tabela 5. Resultados obtidos após determinação do NMP/g de coliformes termotolerantes na escola II..... | 33 |
| Tabela 6. Resultados obtidos após determinação do NMP/g de coliformes termotolerantes na escola III..... | 34 |
| Tabela 7. Resultados obtidos após pesquisa da presença de <i>E.coli</i> nas escolas I, II e III..... | 35 |
| Tabela 8. Resultados obtidos após contagem das UFC/g de bolores e leveduras na escola I..... | 38 |
| Tabela 9. Resultados obtidos após contagem das UFC/g de bolores e leveduras na escola II..... | 39 |
| Tabela 10. Resultados obtidos após contagem das UFC/g de bolores e leveduras na escola III..... | 40 |
| Tabela 11. Resultados obtidos após contagem das UFC/g de <i>Staphylococcus spp</i> na escola I..... | 43 |
| Tabela 12. Resultados obtidos após contagem das UFC/g de <i>Staphylococcus spp</i> na escola II..... | 44 |
| Tabela 13. Resultados obtidos após contagem das UFC/g de <i>Staphylococcus spp</i> na escola III..... | 45 |
| Tabela 14. Resultados obtidos após contagem das UFC/g de <i>Bacillus cereus</i> na escola I..... | 48 |
| Tabela 15. Resultados obtidos após contagem das UFC/g de <i>Bacillus cereus</i> na escola II..... | 49 |

| | |
|--|----|
| Tabela 16. Resultados obtidos após contagem das UFC/g de <i>Bacillus cereus</i> na escola III..... | 50 |
| Tabela 17. Resultados obtidos após contagem das UFC/g de Clostrídios sulfito redutores nas escolas I, II e III..... | 52 |
| Tabela 18. Análise de água na escola I..... | 53 |
| Tabela 19. Análise de água na escola II..... | 54 |
| Tabela 20. Análise de água na escola III..... | 55 |
| Tabela 21. Resultados obtidos após análise do “swab” de mão de manipuladores da escola I..... | 59 |
| Tabela 22. Resultados obtidos após análise do “swab” de mão de manipuladores da escola II..... | 60 |
| Tabela 23. Resultados obtidos após análise de “swab” de mão de manipuladores da escola III..... | 61 |
| Tabela 24. Susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas de <i>E.coli</i> | 76 |
| Tabela 25. Susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas de <i>S. aureus</i> | 78 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1. Resultados: aspectos gerais de recursos humanos escola I..... | 64 |
| Gráfico 2. Resultados :aspectos gerais de recursos humanos escola II..... | 65 |
| Gráfico 3. Resultados: aspectos gerais de recursos humanos escola III..... | 65 |
| Gráfico 4. Aspectos gerais de condições ambientais na escola I..... | 66 |
| Gráfico 5. Aspectos gerais de condições ambientais na escola II..... | 67 |
| Gráfico 6. Aspectos gerais de condições ambientais na escola III..... | 67 |
| Gráfico 7. Aspectos gerais de instalações, edificações e saneamento da escola I..... | 68 |
| Gráfico 8. Aspectos gerais de instalações, edificações e saneamento da escola II..... | 68 |
| Gráfico 9. Aspectos gerais de instalações, edificações e saneamento da escola III..... | 69 |
| Gráfico 10. Aspectos gerais dos equipamentos da escola I..... | 70 |
| Gráfico 11. Aspectos gerais dos equipamentos da escola II..... | 70 |
| Gráfico 12. Aspectos gerais dos equipamentos da escola III..... | 71 |
| Gráfico 13. Aspectos gerais de sanitização da escola I..... | 72 |
| Gráfico 14. Aspectos gerais de sanitização da escola II..... | 72 |
| Gráfico 15. Aspectos gerais de sanitização da escola III..... | 73 |
| Gráfico 16. Aspectos gerais de produção da escola I..... | 74 |
| Gráfico 17. Aspectos gerais de produção da escola II..... | 74 |
| Gráfico 18. Aspectos gerais de produção da escola III..... | 75 |

RESUMO

Os alimentos são passíveis de contaminação por diferentes agentes etiológicos que podem levar ao desenvolvimento de doenças afetando a saúde humana desencadeada por microrganismos patogênicos ou suas toxinas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a merenda servida às crianças, e as condições de preparo desta, através da análise microbiológica dos principais micro-organismos envolvidos em doenças transmitidas por alimentos. Este trabalho analisou 78 amostras de diferentes tipos de alimento servido para as crianças em 3 escolas do ensino infantil da cidade de São José do Rio Preto, 21 amostras de água utilizada no preparo da merenda e 29 amostras de Swab das mãos dos manipuladores. Avaliou-se a merenda quanto a presença de *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, determinação do número mais provável de coliformes totais e termotolerantes, contagem de *Bacillus cereus*, Clostrídios sulfito redutores, *Staphylococcus* coagulase positiva e bolores e leveduras. As amostras de água foram avaliadas quanto a contagem total de bactérias heterotróficas, coliformes totais, termotolerantes e pesquisa de *E.coli*. Investigou-se coliformes totais, termotolerantes, pesquisa de *E.coli*, contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e bolores e leveduras nas amostras de swab. Quando presentes cepas de *E. coli* e *S. aureus* foi realizado teste de sensibilidade a antimicrobianos. Para avaliação das condições de preparo da merenda realizou-se um check list nas cozinhas das escolas. 100% das amostras estavam de acordo com a legislação na contagem de *Bacillus cereus*, Clostrídios sulfito redutores e pesquisa de *Salmonella spp.* 7,7% das amostras apresentaram contagens iguais ou superiores a 1100 NMP para coliformes totais, 1,3% não atendiam aos padrões estabelecidos para coliformes termotolerantes, em 6,4% das amostras foi detectado a presença de *E.coli* 1,3% apresentou contagens superiores a 10^3 UFC para *Staphylococcus* coagulase positiva e 6,4% das amostras apresentaram contagens superiores a 10^4 UFC para bolores e leveduras. Nas amostras de água 38% estavam fora dos padrões estabelecidos para contagem de heterotróficos e 10% apresentaram presença de *E.coli*. Foi encontrado *E.coli* em 10% das amostras de swab analisadas. Na realização do check list, foi observado a necessidade de investimentos e treinamento dos manipuladores, pois uma das escolas apresentou apenas 29% de conformidade neste quesito. Os resultados deste estudo apontam a necessidade de melhores condições de higiene no preparo dos alimentos, treinamento para os manipuladores, para que sejam servidos às crianças alimentos de melhor qualidade, pois a merenda analisada oferece risco às crianças.

Palavras chave: Avaliação microbiológica, alimentação escolar, condições higiênico-sanitárias.

ABSTRACT

Foods are susceptible to contamination from different etiologic agents which can lead to the development of illnesses affecting human health triggered by pathogenic microorganisms or their toxins. The objective of the study is to evaluate the conditions in which the school meals are served to the children through a microbiological analysis of the principal food-related pathogens. This work analyzed 78 samples of different types of food served to children from 3 infant schools in the city of São José do Rio Preto, 21 water samples used in the preparation of school meals and 29 swab samples from the hands of the food handlers. The food samples were analyzed for the presence of *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, the most probable number (MPN) of total and thermotolerant coliforms, the amount of *Bacillus cereus*, sulphite-reducing *Clostridium*, coagulase-positive *Staphylococcus*, mould and yeast. The water samples were tested for the total heterotrophic bacteria, total coliforms, thermotolerants, and traces of *E. coli*. The swab samples were analysed for total coliforms, thermotolerants, traces of *E. coli*, the amount of coagulase-positive *Staphylococcus*, mould and yeast. The strains of *E. coli* and *S. aureus* found were subjected to antimicrobial susceptibility testing. To evaluation of conditions of preparation of the meal took place a check list in school kitchens. 100% of the samples were in accordance with the legislation for the amount of *Bacillus cereus*, sulphite-reducing *Clostridium* and traces of *Salmonella spp.* 7.7% of the samples presented results equal to or above 1100 MPN for total coliforms while 1.3% did not comply with the standards established for thermotolerant coliforms. In 6.4% of the samples the presence of *E. coli* was detected; 1.3% presented results higher than 10^3 colony-forming units (CFU) for coagulase-positive *Staphylococcus* and 6.4% of the samples presented results higher than 10^4 CFU for mould and yeast. In the water samples 38% did not comply with the standards established for the amount of heterotrophs, and the presence of *E. coli* was detected in 10%. *E. coli* was also discovered in 10% of the analyzed swab samples. In carrying out the check list, it was observed the need for investment and training of handlers, because one school had only a 29% compliance in this regard. The results of this study suggest the necessity for better conditions of hygiene in the preparation of food, training for the food handlers, so that food of better quality is served to the children, preventing the transmission of illnesses. The results have been communicated to those responsible for the schools involved.

Key Words: Microbiological evaluation, school meals, hygiene and sanitary conditions

1.0 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A alimentação adequada é um direito fundamental do ser humano reconhecido internacionalmente pela Declaração Universal dos Direitos Humanos (art. 25). Segundo o Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE), os alunos tem direito a uma alimentação segura do ponto de vista nutricional e microbiológico. A insegurança alimentar tem sido documentada em países de toda gama de rendas nacionais, desde aqueles de mais baixa até os de mais alta renda. Neste sentido, a maioria dos países latino-americanos, incluindo o Brasil, está no meio deste espectro (TULANE, 2008).

Os alimentos são passíveis de contaminação por diferentes agentes etiológicos, que podem levar ao desenvolvimento de doenças, afetando a saúde humana, podendo ser desencadeadas por micro-organismos patogênicos ou suas toxinas (NETO CUNHA, et al., 2002). Segundo a Organização Mundial da Saúde – OMS (1984) mais de 60% das enfermidades de origem alimentar é provocada por agentes microbiológicos. Oliveira et al. (2004) estimam que as enfermidades causadas por alimentos contaminados constituem um dos problemas mais difundidos mundialmente, sendo as crianças, idosos e imunocomprometidos os mais acometidos.

Uma importante fonte de contaminação dos alimentos é a água, pois é utilizada no preparo e higienização dos alimentos, sendo seu abastecimento adequado pré-requisito para uma vida saudável. Doenças transmitidas por água contaminada constituem a maior causa de morte em muitas partes do mundo, afetando principalmente crianças (FAWEEL et al., 2003).

Entre os micro-organismos mais importantes estão os fungos (bolores e leveduras) e as bactérias (GAVA, 2004). Bactérias patogênicas, que se destacam na maioria das infecções e toxiinfecções alimentares, como *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, Clostrídios sulfito redutores e Estafilococos coagulase positiva, estão entre os principais micro-organismos presentes nas carnes de frango e bovina cruas ou processadas (MESQUITA et al., 2006), alimentos estes comumente presentes no cardápio da alimentação escolar.

Existe um grande número de fatores que contribuem para tornar um alimento inseguro. Entre as principais causas estão o controle inadequado de temperatura durante o cozimento, resfriamento ou estocagem, higiene pessoal insuficiente e contaminação

cruzada entre alimentos crus e processados (FORSYTHE, 2005). O controle desses fatores é muito importante durante a produção e o armazenamento de alimentos, pois registros epidemiológicos revelam que a maioria dos surtos de doenças de origem alimentar diagnosticados é atribuída a patógenos veiculados por alimentos preparados nestes locais (MENDES et al., 2004).

Patógenos veiculados por alimentos estão se tornando resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado. Peresi et al. (2006) ao analisarem a susceptibilidade de cepas envolvidas em surtos alimentares na região de São José do Rio Preto - SP encontraram cepas resistentes aos antimicrobianos testados.

A produção de alimentos seguros pode ser feita por meio de boas práticas higiênicas durante a produção, processamento, manipulação e distribuição dos alimentos (FORSYTHE, 2005).

Como nos dias de hoje cada vez mais as crianças permanecem em escolas por período integral, realizando, nestes locais, suas principais refeições, torna-se necessária para garantir uma alimentação segura a essas crianças, o conhecimento da qualidade microbiológica dos alimentos consumidos, na água utilizada no seu preparo, bem como dos locais onde são preparados e de seus manipuladores visando a minimização dos riscos à saúde e aumento da segurança alimentar.

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a alimentação servida às crianças nas creches quanto aos principais micro-organismos envolvidos em doenças transmitidas por alimentos

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar na merenda escolar a presença de *Salmonella* spp e quantificar *Staphylococcus* coagulase positiva, *Bacillus cereus*, Clostrídios sulfito redutores, coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e bolores e leveduras.
- Verificar a qualidade microbiologia da água utilizada no preparo da merenda.
- Verificar a susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *E.coli* e *S.aureus*
- Verificar as condições de preparo da merenda através da realização de um check list nas cozinhas.

3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Merenda escolar

O Brasil é o país da América Latina com a maior e a mais diversificada experiência em programas de alimentação e nutrição em escolas (SILVA, GERMANO, GERMANO, 2003). A Lei Federal 5829/1972 instituiu o Programa Nacional de Alimentação do Escolar (PNAE), com objetivo de suplementar a alimentação dos matriculados no ensino fundamental e pré-escolares em escolas estaduais e filantrópicas. Em 1994, a Lei 8913, descentralizou a merenda escolar ficando estabelecido que os estados e municípios deveriam selecionar alimentos para o PNAE e realizar o controle da qualidade, desde a produção até a distribuição (SILVA, et al 2000).

No estado de São Paulo, o Departamento de Suprimento Escolar (DSE) é responsável pelo serviço de alimentação de alunos matriculados desde a pré-escola até o ensino fundamental, planejando, coordenando, acompanhando e avaliando todo programa de merenda escolar do estado (CALIL e AGUIAR, 1999).

Nas escolas, o controle das condições higiênico-sanitárias dos processos de produção e distribuição da alimentação oferecida aos estudantes é importante, para garantia da qualidade e prevenção de doenças transmitidas por alimentos (TORRES et al. 2007). Este fato é de particular importância pois as crianças ainda não possuem o sistema imunológico totalmente desenvolvido, estando mais susceptíveis a enfermidades transmitidas por alimentos (SILVA, GERMANO , GERMANO, 2003).

Os programas de alimentação escolar oferecem riscos, sobretudo devido a possibilidade de contaminação e desenvolvimento bacteriano. Devido ao grande número de refeições, faz-se necessário que sejam preparadas com muita antecedência, possibilitando maior exposição a contaminantes e a proliferação de micro-organismos (RICHARDS et al., 1993).

Menezes et al. (2004) consideram que uma alimentação escolar de qualidade é um instrumento fundamental na conscientização da recuperação de hábitos alimentares saudáveis, sobretudo, na promoção da segurança alimentar das crianças e jovens do Brasil.

3.2 Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs)

Cada vez mais com a urbanização e o crescimento populacional o número de refeições realizadas fora de casa vem aumentando e desproporcionalmente a esse crescimento está o treinamento, educação dos manipuladores e o controle sanitário desses alimentos vendidos na rua (SOUSA, 2008). São conhecidos mais de 250 tipos diferentes de agentes que podem ser transmitidos por alimento (Jay et al, 2005)

As enfermidades de origem alimentar ocorrem quando uma pessoa contrai uma doença devido à ingestão de alimentos contaminados com micro-organismos ou por toxinas. Os sintomas mais comuns incluem dor de estômago, náuseas, vômitos, diarreia e febre (FORSYTHE, 2005).

As DTAs podem ser divididas em intoxicação e infecção alimentar onde na intoxicação a causa é a ingestão de alimentos contendo toxinas microbianas pré-formadas, não sendo necessária a presença dos micro-organismos produtores no alimento. Contrariamente à intoxicação, a infecção alimentar é causada pela ingestão de alimento contaminado por patógenos, seguida pela multiplicação destes no hospedeiro (MADIGAN et al., 2010).

Doenças alimentares constituem um dos maiores problemas de Saúde Pública no mundo, sendo responsáveis por reduções no crescimento econômico global. A contaminação dos alimentos por patógenos, sua persistência, multiplicação e/ou produção de toxinas é de interesse em saúde pública. Muitos desses problemas podem ser controlados por esforços e treinamentos constantes dos manipuladores. Diferente dos componentes químicos a concentração dos patógenos pode variar bastante durante as etapas de processamento, dificultando a estimativa do número desses micro-organismos e a concentração das toxinas no momento da ingestão desses alimentos pelo consumidor (SOUSA, 2008).

Segundo o Ministério da Saúde de 1999 a 2009 foram registrados 6.349 surtos de DTAs pela Secretária de Vigilância em Saúde (SVS), com acometimento de 123.917 pessoas e 70 óbitos no Brasil. Do total dos surtos notificados 41,1 % deles tiveram origem bacteriana, sendo os agentes mais frequentes *Salmonella spp.*, *Staphylococcus spp.* e *Bacillus cereus* e 51,3% tiveram sua origem ignorada. De acordo com SVS as instituições de ensino ocuparam o terceiro lugar em ocorrências de surtos.

A maioria dos surtos é decorrente da manipulação e preparação inadequada dos alimentos, afetando pequeno número de indivíduos, porém ocasionalmente, há surtos que afetam grande número de indivíduos.(MADIGAN et al., 2010). A grande maioria dos casos não é diagnosticada ou não é relatada devido a complexa cadeia de eventos antes da doença ser oficialmente contabilizada (SOON; SINGH; BAINES, 2011)

3.2.1 Manipuladores de Alimentos

Os manipuladores são a principal via de contaminação dos alimentos (MELLO, 2010). A RDC 216/2004a classifica como manipulador de alimentos qualquer pessoa do serviço de alimentação que entra em contato direto ou indireto com o alimento.

Muitos estudos tem demonstrado que a causa de surtos esta diretamente ligada aos manipuladores. Almeida (2005) e Laggaggio (2002) avaliaram o nível de contaminação das mãos constatando higienização deficiente. Um estudo realizado por Ferreira et al. (2003) encontrou cepas de *Staphylococcus aureus* colonizando a mucosa nasal desses profissionais, podendo ser fonte de contaminação dos alimentos .

Os manipuladores são uma peça fundamental na segurança alimentar e podem contribuir na transmissão de patógenos durante as etapas de produção, processamento, distribuição e manipulação dos alimentos (ANGELILLO et al., 2000) sendo necessário treinamento constante para minimizar a contaminação e transmissão de patógenos para os alimentos.

3.3 Avaliação da qualidade microbiológica

3.3.1 Bactérias do grupo coliforme

3.3.1.1 Coliformes Totais

O grupo dos coliformes totais é um subgrupo da família *Enterobacteriaceae* que inclui 44 gêneros e 176 espécies. No grupo dos coliformes totais estão apenas as enterobactérias capazes de fermentar lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. Mais de 20 espécies pertencem a esse grupo, dentre as quais estão tanto bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos e outros animais de sangue quente, como

a *Escherichia coli* e também bactérias não entéricas como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, dentre outras (SILVA et al., 2010). Apresentam-se morfológicamente sob coloração de Gram como Bacilos Gram negativos, não esporuladas. São utilizados como indicadores microbiológicos, empregados com maior frequência para avaliar a segurança e a sanificação do que a qualidade dos alimentos (JAY, 2005). Podem ser utilizados também como indicadores de falha no processo ou de contaminação pós-processamento em alimentos pasteurizados, pois são facilmente destruídos pelo calor e não devem sobreviver ao tratamento térmico (SILVA et al., 2010).

3.3.1.2 Coliformes Termotolerantes

O grupo de coliformes termotolerantes, comumente chamado de coliformes fecais, é um subgrupo dos coliformes totais, restrito aos membros capazes de fermentar lactose em 24 horas a 44,5-45,5°C, com produção de gás, sendo seu principal representante *Escherichia coli*.

São assim, como o grupo dos coliformes totais, utilizados como indicadores das condições de higiene dos processos, pois são facilmente inativados por sanitizantes, e capazes de colonizar vários nichos quando a sanitização é falha (SILVA et al., 2010).

Atualmente, a premissa de que elevados números de *E. coli*, coliformes termotolerantes, coliformes totais ou enterobactérias em alimentos estão correlacionados com a contaminação fecal já não é válida, pois esses micro-organismos não são habitantes obrigatórios do trato intestinal de animais de sangue quente, podendo ser encontrados em reservatórios ambientais. São comuns em ambientes de manufatura, podendo se tornar parte da microbiota residente quando as condições de limpeza não são adequadas. Algumas cepas podem crescer em alimentos refrigerados (SILVA et al., 2010).

Com base nesses fatos a Food and Agricultural Organization (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) concluíram que não é possível avaliar a inocuidade dos alimentos em função dos níveis desses micro-organismos. Um alto índice pode estar relacionado com a presença de patógenos entéricos, porém, frequentemente não está. Da mesma forma, sua ausência nem sempre significa que os produtos estejam livres de bactérias patogênicas (SILVA et al., 2010).

3.3.1.3 *Escherichia coli*

E.coli está incluída tanto no grupo dos coliformes totais quanto no dos coliformes termotolerantes. Seu habitat natural é o trato intestinal de animais de sangue quente, embora também possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais (SILVA et al., 2010).

A maioria das linhagens de *E.coli* não é patogênica, funcionando apenas como indicadores, porém diferente das outras bactérias do grupo coliforme, algumas linhagens de *E.coli* são potenciais patógenos transmitidos por alimentos. São conhecidas 200 linhagens patogênicas, sendo várias caracterizadas por produzir potentes enterotoxinas (MADIGAN et al., 2010).

Com relação às infecções intestinais, pelo menos 6 categorias de *E. coli* são conhecidas: enteroinvasora (EIEC), enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica (EPEC), entero-hemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAggEC) e a que adere difusamente (DAEC) (TRABULSI et al, 1999).

O consumo de carne crua ou mal cozida, principalmente carne moída processada em massa, contaminada com cepas de *E.coli* O157:H7 é a causa mais comum desta infecção. A O157:H7 é uma linhagem de *E.coli* enterohemorrágica, bem conhecida por produzir no intestino uma toxina muito potente chamada verotoxina, que causa tanto diarreia hemorrágica como insuficiência renal. A O157:H7 é responsável por pelo menos 60.000 infecções e 50 óbitos decorrentes de doença transmitida por alimentos a cada ano nos Estados Unidos (MADIGAN et al., 2010).

Linhagens de EPEC são responsáveis por doenças diarreicas em bebês e crianças pequenas, porém não causam doença invasiva, nem produzem toxinas. Linhagens de EIEC provocam doença invasiva do cólon, produzindo diarreia aquosa e às vezes sanguinolenta. As ETECs são responsáveis pela diarreia do viajante, tendo como principais veículos alimentos como verduras, legumes frescos e a água. As linhagens de ETEC são produtoras de enterotoxinas termolábeis (MADIGAN et al, 2010).

3.3.2 *Staphylococcus coagulase positiva*

São cocos Gram positivos, catalase e coagulase positiva, apresentando-se morfológicamente em arranjos em forma de cachos de uva (TRABULSI et al, 1999).

O gênero *Staphylococcus* inclui mais de 30 espécies, das quais 18 tem potencial interesse em alimentos, e destas apenas seis são coagulase positiva. A principal espécie que coloniza o homem, produz enterotoxinas e esta frequentemente envolvida em intoxicações alimentares é o *S. aureus*. (Jay, 2005)

Staphylococcus aureus é um importante patógeno humano, capaz de provocar uma ampla gama de intoxicações. É produtor de enterotoxinas, que causam doenças veiculadas por alimentos no mundo todo (SOUSA, 2008). *Staphylococcus* são membros normais da microbiota local da pele e do trato respiratório superior de praticamente todos os seres humanos, sendo frequentemente patógenos oportunistas. Muitas vezes *S. aureus* está associado a uma intoxicação alimentar, pois é capaz de se multiplicar em vários alimentos e algumas linhagens produzem várias enterotoxinas termoestáveis. Se a enterotoxina for ingerida com o alimento desenvolve-se uma gastroenterite, em um período de uma a seis horas, caracterizada por náuseas, vômitos e diarreia (MADIGAN et al., 2010).

S. aureus produz pelo menos sete toxinas diferentes, sendo a mais comum a enterotoxina A, que também é considerada um superantígeno, pois ao chegar no intestino ativa uma resposta inflamatória geral que provoca gastroenterite e significativa perda de fluidos (MADIGAN et al., 2010).

A falta de higiene dos manipuladores durante a preparação da comida é uma das maiores fontes de contaminação por bactérias patogênicas. Juntamente a isso *S. aureus* pode tolerar uma ampla faixa de pH, temperatura e salinidade. Um conhecimento específico sobre as rotas de contaminação é importante para um controle efetivo dos surtos (HUONG et al., 2010).

Segundo Silva (2010), os alimentos que possuem maior risco são aqueles que são altamente manipulados durante o preparo ou que permaneceram muito tempo à temperatura ambiente, como tortas de creme, bombas de chocolate, sanduíches com recheio, produtos lácteos e derivados e saladas.

PEREIRA et al, (2009) ao analisarem fatores de virulência e capacidade de produzir toxinas em cepas de *Staphylococcus* isoladas de diferentes fontes de alimentos em Portugal, ressaltam a necessidade da prevenção e cuidados para evitar a contaminação.

As características intrínsecas do alimento são um fator importante a ser observado para evitar a proliferação do *Staphylococcus* e produção de toxinas, pois enquanto a bactéria é facilmente destruída pelo calor em qualquer fase do

processamento, sua toxina é termoestável suportando tratamentos tão severos como a esterilização em alimentos de baixa acidez (SOUSA, 2008; SILVA, 2010).

3.3.3 Gênero *Salmonella*.

São bacilos Gram negativos, facultativos, transmitidas pelo consumo de água ou alimento contaminados, sendo os mais envolvidos a carne moída, linguiça, carnes de aves, bife assado preparado comercialmente e ovos. As principais fontes de muitas salmonelas são os animais, e não o homem (PELCZAR et al., 1996). Todas as salmonelas são consideradas patogênicas em algum grau, causando salmonelose ou gastroenterite por *Salmonella* (TORTORA et al, 2008).

A maioria dos sorotipos tem um espectro amplo de hospedeiros e provocam gastroenterite sem complicações e necessidade de tratamento. Em crianças, idosos e indivíduos com o sistema imunológico debilitado essas infecções podem ser severas. Os sorotipos mais importantes na transmissão de animais para humanos são *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium (SILVA et al., 2010).

Segundo SILVA (2010), *Salmonella* é o principal agente de origem alimentar em várias partes do mundo e também no Brasil. Ela pode ser encontrada no trato intestinal de homens e animais, sendo fácil compreender a contaminação generalizada de carnes e vegetais e a dificuldade em controlar a infecção (SOUSA, 2008). Resíduos fecais de animais e humanos contaminados constituem importante fonte da contaminação bacteriana na cadeia alimentar (PONCE et al., 2008).

A salmonelose mais comum causa enterocolite, onde a ingestão de alimentos contendo células viáveis resulta na colonização do intestino delgado e grosso. O início da doença ocorre entre 8-48 horas após a ingestão. Os alimentos frequentemente envolvidos são: alimentos frescos como ovos, carnes e laticínios, produtos preparados a base de ovos crus, como cremes e derivados cárneos, como embutidos (MADIGAN et al., 2010).

Salmonella pode ser destruída por processos que envolvem altas temperaturas, como o cozimento e a pasteurização. Agentes sanitizantes também são eficazes na sua destruição, porém congelamento, refrigeração e secagem não a destroem, mas previnem sua multiplicação (ABUSHELAIIBI et al., 2003).

3.3.4 *Bacillus cereus*

São bacilos Gram positivos, anaeróbios facultativos, formadores de esporos (TRABULSI). Os esporos apresentam resistência térmica podendo resistir até 6.3 minutos em caldo de arroz a 100°C (SILVA et al., 2010). A multiplicação das células vegetativas após a germinação dos esporos pode ocorrer em uma ampla faixa de temperatura, pH e atividade de água, causando doenças alimentares e deterioração dos alimentos (CARLIN, 2008).

Este microrganismo tem o solo como seu reservatório natural. Entretanto devido a resistência de seus esporos, pode ser isolado de uma grande variedade de pontos, estando amplamente distribuído na natureza, por esta razão contamina facilmente alimentos como vegetais, cereais, condimentos, carnes bovinas, suínas e de frango, laticínios, pratos a base de arroz e vegetais cozidos (MENDES et al., 2004).

Os esporos estão entre as formas de vida mais resistentes. Essa resistência favorece a sobrevivência durante as etapas de processamentos dos alimentos, e também por longos períodos de estocagem (CARLIN, 2008).

As doenças provocadas por *B. cereus* são intoxicações, resultantes da ingestão de toxinas formadas no alimento, quando ocorre multiplicação das células. Dois tipos de doenças são conhecidas: síndrome diarréica, caracterizada por dores abdominais e diarreia com período de incubação de 8-16 horas e sintomas entre 12-24 horas, sendo provocada pela toxina diarréica, uma proteína termo sensível inativada a 56°C/5min. A outra é síndrome emética, caracterizada por provocar náusea e vômito após 1-5 horas do consumo do alimento contaminado. A diarreia não é sintoma predominante neste caso, mas pode ocorrer. É provocada pela toxina emética, altamente resistente ao calor, podendo suportar cozimento e tratamentos térmicos muito severos, como 126°C por 90 minutos ou 120°C por mais de uma hora (SILVA et al., 2010).

Sua presença no alimento não representa risco à saúde, a menos que possa se multiplicar e atingir populações maiores do que 10⁵ células viáveis por grama. Os alimentos mais implicados em surtos são os cozidos, pois o cozimento ativa os esporos e, se a refrigeração não for adequada, esses esporos podem germinar e produzir toxina (SILVA et al., 2010).

3.3.5 Clostrídios sulfito redutores

São bacilos Gram positivos esporulados e anaeróbios, facilmente encontrados no solo, água e trato intestinal de homens e animais (TRABULSI; PELCZAR et al., 1996).

Clostrídios sulfito redutores, como diz o nome, são os clostrídios que reduzem o sulfito a sulfeto de hidrogênio (H_2S) a $46^\circ C$. Sua aplicação na análise de alimentos é oferecer uma indicação simples e rápida da presença de *Clostridium perfringens*, que também é sulfito redutor. Como *C. perfringens* se multiplica bem a $46^\circ C$, essa temperatura é utilizada para dar uma indicação mais precisa de *C. perfringens*, reduzindo o número de espécies que podem crescer (SILVA et al., 2010).

Clostridium perfringens pode ser considerado um dos maiores patógenos de origem alimentar devido a vários aspectos, entre eles por ser amplamente distribuído na natureza, apresentar rápida multiplicação, sendo o tempo de geração menor do que 10 minutos em condições ótimas e ser capaz de produzir mais de 15 toxinas capazes de causar diferentes doenças em humanos e animais (LINDSTROM et al., 2011).

Cada cepa de *C. perfringens* é capaz de produzir apenas um número limitado das inúmeras toxinas conhecidas. Com base na capacidade de produzir as 4 toxinas mais letais, as cepas da espécie são classificadas em 5 tipos A, B, C, D e E. Onde o tipo A produz apenas a toxina alfa e é o principal envolvido em doenças alimentares. O tipo C produz toxinas alfa e beta e provoca uma doença necrótica, bem mais séria, embora mais rara (SILVA et al, 2010).

A intoxicação alimentar é resultante da ingestão de uma grande dose de *Clostridium perfringens* ($>10^8$ células), presente em alimentos cozidos ou crus contaminados. Os endosporos germinam em condições anóxicas, como no interior de recipientes selados. Após o consumo do alimento contaminado, as células vivas iniciam o processo de esporulação no intestino, que coincide com a produção da enterotoxina perfringens. A toxina altera a permeabilidade do epitélio intestinal provocando náuseas, diarreia e cólicas intestinais, geralmente sem febre. A intoxicação estabelece-se entre 7-15 horas após o consumo e geralmente desaparece após 24 horas (MADIGAN et al., 2010).

A maioria dos surtos de gastroenterite está associada com carnes ou ensopados de carne contaminados com conteúdo intestinal do animal durante o abate (TORTORA et al., 2008). Embora seja uma bactéria anaeróbia, a sensibilidade de *C. perfringens* ao

oxigênio é menos acentuada que os outros clostrídios, podendo crescer no interior da massa de alimentos (SILVA et al., 2010).

Ótimas condições para intoxicações alimentares acontecem, quando o alimento contaminado com cepas de *C. perfringens* são refrigeradas lentamente ou servidas a temperaturas entre 10 e 54° C, permitindo rápida germinação e crescimento (LINDSTROM et al., 2011).

3.3.6 Bactérias heterotróficas

São micro-organismos ubíquos que utilizam nutrientes orgânicos para sua multiplicação (SOUSA, 2008). São indicativos gerais da população microbiana em um alimento. São utilizados para se obter informações gerais sobre a qualidade dos produtos, práticas de manufatura, matérias primas utilizadas, condições de processamento e manipulação. Não são considerados indicadores de segurança por não estarem relacionados diretamente a presença de patógenos ou toxinas (SILVA et al., 2010).

A contagem de bactérias heterotróficas na água constitui uma ferramenta para acompanhar variações nas condições do processo no caso das águas minerais, ou a eficiência das diversas etapas de tratamento, no caso de águas tratadas. Permite ainda verificar as condições higiênicas em diferentes pontos da rede de distribuição (SILVA et al., 2005).

3.3.7 Fungos filamentosos e leveduras

Os fungos constituem um grande grupo de micro-organismos, originária de diversos nichos ecológicos. Os fungos filamentosos são extremamente versáteis, sendo a maioria capaz de assimilar qualquer fonte de carbono derivada de alimentos. As leveduras de maneira geral são mais exigentes. Muitas são incapazes de assimilar nitrato e carboidratos complexos, algumas exigem vitaminas e outras não conseguem utilizar a sacarose como única fonte de carbono (SILVA et al., 2010).

São bastante resistentes a condições adversas, como pH ácido e atividade de água baixa. Os fungos deteriorantes de alimentos, como quase todos os outros fungos filamentosos, exigem oxigênio para sua multiplicação, podendo ser considerados aeróbios estritos (SILVA et al., 2010).

Os fungos são indicadores de eficiência do processo de sanitização de equipamentos e utensílios durante o processamento de alimentos, pois esses micro-organismos são considerados agentes potenciais de deterioração, com poder de oxidação de diferentes substratos, como os carboidratos (BRITO; ROSSI, 2005).

Além de reduzir a vida útil do produto, um grande número de fungos produz substâncias tóxicas denominadas micotoxinas (metabólitos secundários) as quais oferecem perigo para a saúde do consumidor causando danos no sistema nervoso e circulatório. As micotoxinas também apresentam características mutagênicas e carcinogênicas (MADIGAN et al, 2010; JAY, 2005).

A multiplicação de fungos toxigênicos e a produção de micotoxinas estão relacionadas com fatores físico-químicos e biológicos, sendo os principais relacionados a umidade, temperatura, co-cultura (presença de outros micro-organismos), disponibilidade de nutrientes e atmosfera de desenvolvimento (BAPTISTA et al., 2004) As intoxicações ocorrem mais frequentemente devido ao consumo de cereais, amendoim, grãos de café e presuntos curados (PELCZAR et al., 1996).

3.4 Água

A água constitui um dos mais importantes recursos para a manutenção da vida. Entretanto, doenças associadas à sua contaminação representam uma das maiores ameaças à saúde humana (CARDOSO et al., 2007). Hoje, na maioria dos países industrializados, a água potável é classificada como alimento, e elevados padrões são definidos por sua qualidade e segurança (SZEWZYK et al., 2000).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), bactérias, protozoários, vírus e helmintos compreendem os agentes biológicos mais importantes de contaminação da água e, conseqüentemente, dos alimentos. Doenças de origem hídrica decorrem da ingestão direta ou indireta de água contaminada por micro-organismos patogênicos. Entre os grupos mais expostos estão as crianças, imunodeprimidos e idosos.

Uma vez que as crianças são especialmente vulneráveis, e sabendo-se que o ambiente escolar representa sua segunda casa, ocupando cerca de um terço de seu dia, faz-se necessário um acompanhamento e monitoramento da qualidade da água (ALMEIDA et al., 2009).

A maioria dos agentes patogênicos não são capazes de crescer e se proliferar em água. Alguns micro-organismos como *E. coli* e *Campylobacter* se acumulam no sedimento e são mobilizados quando aumenta o fluxo de água. Vírus e fases latentes de outros microrganismos, como cistos, oocistos e ovos, são incapazes de se multiplicar na água. Por outro lado, grandes quantidades de carbono orgânico e baixas concentrações de cloro residual favorecem o crescimento de *Legionella*, *Vibrium cholerae* e *Acanthamoeba*. A qualidade microbiológica da água pode variar de forma ampla e rápida. Picos de curto prazo na concentração do patógeno podem aumentar consideravelmente os riscos de doenças e também causar surtos (OMS).

Nos serviços de alimentação coletiva, uma vez que a água é empregada em diversos procedimentos de higienização, como ingrediente e no preparo de alimentos, assim como para consumo direto, é importante que sejam adotadas práticas para sua análise e controle rotineiros dos reservatórios. O monitoramento da qualidade microbiológica da água destinada para o consumo humano, por meio de pesquisas de agentes contaminantes, principalmente os micro-organismos de origem entérica, representa uma possibilidade da diminuição de inúmeros surtos de doenças (CARDOSO et al., 2007).

3.5 Resistência aos antimicrobianos

Na década de 1990, a resistência aos antimicrobianos emergiu em nível mundial como um dos temas em maior interesse em saúde pública (PERESI et al., 2006). São cada vez maiores os índices de resistência das bactérias frente aos antimicrobianos testados, representando um sério problema mundial. Amostras de *E. coli* isoladas de aves são frequentemente resistentes para mais de uma droga. Isto se deve principalmente ao uso indiscriminado e prolongado, concentrações subterapêuticas e terapias inadequadas de antimicrobianos que proporciona uma pressão na seleção de genes de resistência antimicrobiana (ZANATTA et al, 2004).

Resistência aos fármacos antimicrobianos consiste na capacidade adquirida por um micro-organismo de resistir aos efeitos de um agente quimioterápico ao qual ele é normalmente susceptível (MADIGAN et al, 2010)

A grande preocupação na área de alimentos, é que bactérias como *E. coli* resistentes aos antibióticos podem ser transferidas através da cadeia alimentar ou

mesmo durante o processo de produção dos animais para os seres humanos, dificultando o tratamento com antimicrobianos convencionais (ASLAM, 2006).

Em escala mundial cerca de 50% de todos antibióticos produzidos são utilizados com finalidades agropecuárias, na aquicultura (criação de peixes) e até na produção de frutas. Antibióticos utilizados com muita frequência, por longos períodos e em doses elevadas nos suprimentos alimentares, comprovadamente são uma fonte de surtos de infecções alimentares decorrentes da seleção de patógenos resistentes aos antibióticos (MADIGAN et al, 2010).

Zanatta et al. (2004) ao analisarem 120 cepas de *E.coli* isoladas de aves, encontraram apenas 7 sensíveis a todos antimicrobianos testados e 93 apresentaram resistência a 3 ou mais drogas.

Cada vez mais estudos envolvendo micro-organismos isolados de alimentos tem revelado cepas resistentes. Duarte et al. (2009) ao analisarem 19 amostras de *Salmonella* isoladas de carcaça de frango encontraram 2 resistentes a 8 antibióticos e apenas 1 isolado foi sensível a todos.

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção das amostras

4.1.1 Merenda escolar

Foram coletadas 78 amostras da merenda escolar servidas às crianças. As amostras foram cedidas por 3 escolas de ensino infantil de São José do Rio Preto – SP e foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual Paulista – UNESP.

O quadro abaixo apresenta a distribuição do número de amostras coletadas por dia e por escola. Onde os números representam a variedade de comida servida as crianças naquele dia da coleta.

| Datas | Número de amostras coletadas | | |
|------------|------------------------------|-----------|------------|
| | Escola I | Escola II | Escola III |
| 18/08/2010 | 4 | | 5 |
| 30/08/2010 | 5 | 4 | |
| 08/09/2010 | | 4 | 5 |
| 23/09/2010 | 4 | 4 | |
| 01/10/2010 | 4 | | 4 |
| 18/10/2010 | | 4 | 4 |
| 21/02/2011 | 5 | | |
| 22/02/2011 | | | 4 |
| 02/03/2011 | 5 | | |
| 03/03/2011 | | 5 | |
| 14/03/2011 | | 4 | 4 |
| Total | 27 | 25 | 26 |

As amostras eram coletadas em dias alternados da semana, de forma a abranger todo cardápio servido às crianças. Foram realizadas coletas nos meses de agosto a

outubro de 2010, e fevereiro e março de 2011, totalizando 18 coletas, sendo 6 por escola.

Para obtenção das amostras, primeiramente serviam as crianças e após a homogeneização individual de cada alimento as amostras foram coletadas em frascos previamente esterilizados. Foram coletados em torno de 100g de cada alimento.

As amostras foram transportadas até o laboratório em caixas de isopor com gelo, e lá mantidas em geladeira até análise. As análises microbiológicas foram realizadas no mesmo dia da coleta.

4.1.2 Água

Para coletar as amostras, primeiramente a torneira foi submetida à desinfecção com álcool a 70% e, após um fluxo de 2 minutos, a água foi coletada em frasco estéril contendo 0,2mL de uma solução 1,8% de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) para inativação do cloro residual, conforme metodologia recomendada por Silva et al. (2005).

Foram coletadas em torno de 200 mL de amostras de água utilizadas tanto no preparo, como na higienização dos alimentos. As amostras foram cedidas por 3 escolas de ensino infantil de São José do Rio Preto – SP e foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual Paulista – UNESP.

As amostras foram transportadas até o laboratório em caixas de isopor com gelo, e lá mantidas em geladeira até análise. As análises microbiológicas foram realizadas no mesmo dia da coleta

As amostras foram coletadas nos mesmos dias de coleta da merenda. No ano de 2010 foram coletadas apenas amostras da torneira da cozinha e em 2011 amostras também da água vinda diretamente da rua, para análise bacteriológica da água, sem que esta passasse pela caixa.

4.1.3” Swab” de mão

Os “sawbs” de mão foram realizados após prévia aprovação e parecer do comitê de ética protocolo 0011.0.229.000.10, parecer 067/10, obtido em 8 de Setembro de 2010. Foram coletados “swabs” dos manipuladores que estavam diretamente envolvidos

com a manipulação dos alimentos. Para realização da coleta, esses assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Inicialmente para obtenção das amostras, foram coletados “swabs” da mão direita, quando manipulador era destro, e esquerda, quando canhoto, após o manipulador realizar a higienização. Em uma segunda parte do estudo foi realizada coleta em ambas mãos dos manipuladores. Foram utilizados 2 e 4 “swabs” por manipulador respectivamente, sendo que um era utilizado na parte superior da mão e outro na parte inferior, abrangendo toda superfície.

Os “swabs” foram transportados ao laboratório em caixas de isopor e gelo, contidos em tubos de ensaio contendo 10 mL de solução peptonada 0,1% estéril. As análises microbiológicas foram realizadas no mesmo dia da coleta.

4.2 Preparo das amostras

4.2.1 Merenda Escolar

No laboratório, as amostras foram homogeneizadas e pesadas, sendo que para análise de *Salmonella* pesou-se 25g e para as demais análises pesou-se 10g. Após pesagem essas amostras foram colocadas assepticamente em frascos de Erlenmeyer contendo 90 mL de água peptonada 0,1% estéril constituindo a diluição 10^{-1} . A partir desta, foram efetuadas as demais diluições decimais seriadas até 10^{-3} , em tubos de ensaio contendo 9 mL, do mesmo diluente.

Foram pesquisados micro-organismos do grupo coliforme, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus coagulase positiva*, *Bacillus cereus*, Clostrídios sulfito redutores e bolores e leveduras.

4.2.2 Água

As amostras foram homogeneizadas e realizadas as diluições 10^{-1} e 10^{-2} em água peptonada 0,1%. A primeira diluição foi realizada transferindo-se 10 ml de água para um Erlenmeyer contendo 90 mL. A diluição 10^{-2} foi realizada transferindo-se 1 ml da diluição 10^{-1} para um tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1%.

Para análise da qualidade da água, foram investigadas bactérias do grupo coliforme e contagem de bactérias heterotróficas. Todas as análises foram efetuadas conforme metodologia recomendada por SILVA et al (2005).

4.2.3 “Swab”

No laboratório, as amostras foram homogeneizadas com auxílio de um agitador de tubos, por 10 segundos, em seguida foram realizadas as diluições, sendo que o tubo de 10 mL de água peptonada 0,1% onde o “swab” estava armazenado representava a diluição 10^{-1} , Para realização das outras diluições foi transferido 1mL do tubo 10^{-1} para um contendo 9 mL de água peptonada 0,1% formando a diluição 10^{-2} e assim sucessivamente até diluição 10^{-3} .

Para observação da microbiota das mão dos manipuladores, foram investigadas bactérias do grupo coliforme, *Staphylococcus* coagulase positiva. Na segunda parte da pesquisa foi analisado também a presença de fungos (Filamentosos e leveduras). As análises foram efetuadas conforme metodologia recomendada por Silva et al. (2010).

4.3 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais

Os coliformes são utilizados como modelo indicador, que quando presentes em grandes quantidades representam condições sanitárias precárias (KEERATIPIBUL et al., 2010).

O método de NMP é um método clássico de contagem de coliformes em alimentos. Para a realização da primeira etapa, o teste presuntivo, 3 alíquotas de 3 diluições são inoculadas em três séries de 3 tubos cada de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) por diluição, totalizando 9 tubos por amostra.

Para análise da água, também foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos, onde foram utilizados 3 séries de 5 tubos, totalizando 15 tubos por amostra onde cada série representava uma diluição ($10^0 - 10^{-2}$).

Os tubos foram incubados por 48 horas a 35°C , sendo considerados suspeitos da presença de coliformes aqueles que apresentaram crescimento com produção de gás. Para confirmação, uma alçada dos tubos considerados suspeitos foi transferida para tubos de Caldo Verde Brilhante Bile 2 % (VB) e incubados novamente por 48 horas a 35°C . Tubos que apresentarem crescimento com produção de gás tomando mais de 1/3

do tubo de Durhan foram considerados positivos para coliformes totais (Kornacki, J. L. & Johnson, J. L. 2001).

Para obtenção dos resultados, foi utilizada a combinação dos tubos positivos e comparada à tabela de Hoskins.

4.4 Determinação do NMP de coliformes termotolerantes

Para determinação do NMP de coliformes termotolerantes foram utilizados aqueles tubos considerados suspeitos no teste presuntivo de coliformes totais, dos quais foi retirada uma alçada e transferida para tubos contendo caldo EC. Os tubos foram incubados em banho Maria por 24 horas a 45.5 °C. Foram considerados positivos aqueles que obtiverem crescimento e produção de gás ocupando mais de 1/3 do tubo de Durhan (Kornacki, J. L. & Johnson, J. L. 2001).

Para obtenção dos resultados, foi utilizada a combinação dos tubos positivos e comparadas à tabela de Hoskins.

4.5 Pesquisa de *E. coli*

Os tubos de EC positivos para coliformes termotolerantes são considerados suspeitos da presença de *E. coli*. Para confirmação, uma alçada de cada tubo foi estriada pela técnica de esgotamento, em Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-EMB), meio seletivo diferencial para distinguir *E.coli* dos demais coliformes termotolerantes. As placas foram incubadas por 24 horas a 35°C. Nos casos de desenvolvimento de colônias típicas de *E. coli* (colônias negras com brilho verde metálico) foram realizados os testes bioquímicos para sua confirmação.

Para realização dos testes bioquímicos foi obtida colônia isolada, sendo esta semeada em um tubo inclinada contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA) e incubada em estufa a 35°C por 24 horas. A partir da massa de células crescida neste tubo realizou-se o IMViC, que consiste no teste do Citrato, teste do Indol, teste do Vermelho de Metila e Voges-Proskauer.

Foram consideradas como *E.coli* todas as culturas que apresentaram indol (+) ou (-), Vermelho de Metila (+), Voges-Proskauer (-), Citrato (-), e sob coloração de Gram se apresentaram como bastonetes Gram negativos (Kornacki, J. L. & Johnson, J. L. 2001).

4.6 Contagem de Heterotróficos

Para contagem de heterotróficos em água, foi selecionado o método de contagem em placas, com plaqueamento por profundidade (pour plate), onde foi pipetado 1 mL de cada diluição ($10^0 - 10^{-2}$) em placas de petri previamente esterelizadas, e vertido de 15 a 20 ml de meio de cultura PCA previamente fundido e resfriado a 45 °C. Foi misturado o inóculo com o meio de cultura utilizando-se movimentos na forma de 8.

As placas foram incubadas invertidas por 48 horas a 35 °C após a solidificação do meio de cultura. Todas as diluições foram realizadas em duplicata. Para cálculo dos resultados foram selecionadas as placas que continham de 30 a 300 colônias, sendo calculado o Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) multiplicando-se o número de colônias pelo inverso da diluição e realizando uma média das placas de mesma diluição (SILVA et al., 2005).

4.7 Contagem de bolores e leveduras

Para obtenção do número total de bolores e leveduras foi utilizado o método de plaqueamento por superfície, utilizando o Ágar Dextrose Batata (PDA) acidificado até pH 4,0, com uma solução aquosa de ácido tartárico a 10% previamente preparado e esterilizado.

Foram selecionadas 4 diluições ($10^{-1} - 10^{-4}$) e inoculadas 0.1 mL em placas previamente preparadas e secas. O inóculo foi espalhado por toda superfície da placa com auxílio da alça de Drigalski, até que todo excesso de líquido fosse absorvido.

As placas foram incubadas a 25 °C por cinco dias, sem inverter, em pilhas de não mais que 3 placas. Para obtenção dos resultados, foram selecionadas placas que continham 30 a 300 colônias, as quais foram contadas com auxílio de um contador de colônias. Para cálculo do resultado em UFC/g, multiplicou-se o número de colônias contadas por dez e pelo inverso da diluição. Como cada diluição foi realizada em duplicata, para obtenção dos resultados foi realizada a média entre as duas placas (Samson et al, 1992).

4.8 Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva

Para contagem de *Staphylococcus*, foram selecionadas 3 diluições ($10^{-1} - 10^{-3}$). Foi inoculado 0,1 mL de cada diluição na superfície de placas contendo Ágar Baird Parker (BP), o qual foi suplementado com solução de gema de ovo e telurito de potássio a 1 %. O inóculo foi espalhado com auxílio da alça de Drigalski até que todo excesso fosse absorvido.

As placas foram incubadas invertidas a 35 °C por 48 horas. Foram selecionadas para contagem as placas que continham de 20 a 200 colônias. Foram contadas apenas as colônias típicas de *S. aureus*, ou seja, circulares, pretas rodeadas por uma zona opaca e um halo de hidrólise transparente. As colônias atípicas eram contadas e anotadas separadamente.

Para confirmação, foram selecionadas 5 colônias típicas e 5 colônias atípicas isoladas, quando houvesse, sendo semeadas em PCA, incubadas por 24 horas a 35°C .

Do PCA era realizada a coloração de Gram e aquelas colônias que apresentassem morfologia de cocos Gram positivos eram submetidos ao teste da catalase e uma vez catalase positiva era realizado o teste da DNase e, posteriormente, confirmado pelo teste da coagulase.

No teste da coagulase foi transferida uma alçada da colônia obtida do PCA para um tubo estéril contendo 0,5 mL de plasma de coelho com EDTA. Os tubos foram incubados em banho maria a 37°C e observados de 30 em 30 minutos nas primeiras 6 horas. Os tubos que apresentassem coágulo eram considerados positivos. Os tubos que nas primeiras seis horas não apresentassem coágulo eram deixados até completar 24 horas.

Para obtenção dos resultados, foi calculado o número de UFC/g em função do número de colônias contadas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas pelo teste da coagulase (Bennett & Lancette, 2001).

4.9 Pesquisa do gênero *Salmonella*

A técnica de detecção de *Salmonella* em alimentos é um método de presença e ausência desenvolvido com a finalidade de garantir a detecção mesmo em situações desfavoráveis. O procedimento segue basicamente 4 etapas: pré enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento diferencial e confirmação.

A fase de pré-enriquecimento foi realizada em Caldo Lactosado (CL), onde foram pesados 25 g da amostra previamente homogeneizada e esta foi incubada a 35 °C por 24 horas em 225 mL de CL.

Para fase de enriquecimento seletivo foram utilizados 3 diferentes meios de enriquecimento: Caldo Selenito Cistina, Caldo Tetrionato e Caldo Rappaport Vassilidis. Para os caldos Selenito Cistina e Tetrionato, foi transferido 1 mL do CL e incubado a 35 °C por 24 horas. No caldo Rappaport, foi transferido 0.1 mL do CL e incubado em banho maria a 41.5 °C por 24 horas.

Na etapa de plaqueamento diferencial, foram utilizados 2 meios de cultura, Ágar *Salmonella Shigella* (SSA) e Ágar Verde Brillhante (BG), onde foram plaqueados pela técnica de esgotamento inóculos dos 3 caldos de enriquecimento. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas.

Para confirmação, foram selecionadas colônias típicas isoladas (cremes com centro negro no SSA e vermelhas opacas no BG). Estas foram incubadas em PCA inclinado por 24 horas, para realização dos testes bioquímicos e sorologia.

Como testes bioquímicos, foram utilizados testes de crescimento em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSIA) e Agar Lisina Descarboxilase (LIA). As amostras que apresentaram perfil bioquímico típico de *Salmonella* foram submetidas a sorologia, utilizando anti-soro polivalente somático (FDA, 2005) com modificações.

4.10 Contagem de *Bacillus cereus*

Para contagem de *Bacillus cereus*, foram pesados 2 alíquotas de 10 g cada, e para realização das diluições em um dos frascos foi dado choque térmico para a ativação dos esporos, caso estivessem presentes.

Foram inoculados 0,1 mL de cada diluição (10^{-1} – 10^{-3}) com e sem choque, no *Bacillus cereus* Ágar Base (BCAB) suplementado com solução de gema de ovo e polimixina B. O inóculo foi espalhado por toda superfície da placa com auxílio da alça de Drigalski, até que fosse absorvido pelo meio de cultura.

As placas foram incubadas invertidas a 35 °C por 48 horas. Foram selecionadas para contagem aquelas que continham entre 10 e 100 UFC. Foram consideradas colônias típicas aquelas com coloração creme, com bordas planas e secas e com um grande halo de precipitação devido à reação com a gema de ovo.

Para obtenção dos resultados foi calculado o número de UFC/g em função do número de colônias contadas e multiplicado por 10 e pelo inverso da diluição utilizada (Bennett & Belay, 2001).

4.11 Contagem de Clostrídios sulfito redutores

Para preparação das amostras na análise de clostrídios sulfito redutores, foram realizadas 2 diluições, uma com e outra sem choque térmico, para que caso houvessem esporos estes também pudessem ser contados.

Foram selecionadas 3 diluições e inoculadas em placas, pela técnica de profundidade, utilizando 1mL de inóculo e 20 mL do Agar SPS previamente resfriado a 45 °C. Foi esperado que as placas solidificassem para aplicação de uma sobre-camada do ágar. Após completa solidificação da sobre-camada as placas foram incubadas, sem inverter a 46 °C por 48 horas em atmosfera anaeróbia.

Para obtenção dos resultados foram selecionadas placas contendo entre 20 e 200 colônias e, após contagem, foi multiplicado o número de UFC pelo inverso da diluição utilizada (Labbe, 2001).

4.12 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

As cepas de *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas das amostras de alimentos, água e “swab” das mãos foram submetidas ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.

O método utilizado foi disco difusão recomendado pela CLSI (2011), segundo Bauer et al. (1966) onde o inóculo foi preparado na escala 0.5 McFarland e semeadas em Ágar Mueller-Hinton (MHA). As amostras foram incubadas a 35° C por 18-24 horas. Para controle de qualidade dos testes foram utilizadas as seguintes cepas padrão ATCC (American Type Culture Collection) *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Os antimicrobianos foram testados os seguintes antibióticos, de acordo com a recomendação do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2011. As cepas de *E. coli* foram testadas frente a Cefalotina (30µg), Amikacina (30µg), Cefepime (30µg), Ofloxacin (5µg), Piperaciclina (100µg), Levofloxacin (5µg), Imipenem (10µg), Amoxicilina + Ácido clavulanico (20/10µg), Ceftazidime (30µg), Ampicilina +

sulbactam (10/10 μ g), Cefotaxime (30 μ g), Ceftiofur, Tobramicina (10 μ g), Ertapenem (10 μ g) Gentamicina (10 μ g), Aztreonam (30 μ g), Moxifloxacin, Cefoxitim (30 μ g) e as cepas de *Staphylococcus aureus* frente a Penicilina (10 unidades), Oxacilina (1 μ g), Gentamicina (10 μ g), Azitromicina (15 μ g), Clindamicina (2 μ g), Sulfa + Trimetropim (23.75/1.25 μ g), Cloranfenicol (30 μ g), Linezolida (30 μ g), Tetraciclina (30 μ g), Ciprofloxacino (5 μ g) e Eritromicina (15 μ g).

As cepas foram classificadas de acordo com o tamanho do halo em sensíveis, intermediárias e resistentes.

4.13 Aplicação do Check List

No período de Novembro de 2009 nas escolas I e II e outubro de 2010 na escola III, foi realizado nas cozinhas onde são preparadas a merenda escolar um questionário para avaliar as Boas Prática de Fabricação (BPF), que de acordo com a resolução RDC 216 de 15 de Setembro de 2004a da vigilância sanitária tem como definição procedimentos que devem ser adotados por serviços de alimentação a fim de garantir a qualidade higiênico-sanitária e a conformidade dos alimentos com a legislação sanitária.

O check list constou de 130 itens divididos em 6 categorias abrangendo aspectos gerais de recursos humanos, de condições ambientais, de instalações edificações e saneamento, de equipamentos, de sanitização e de produção.

O questionário foi adaptado para as cozinhas escolares de acordo com a RDC 275 de 21 de outubro de 2002. As opções de resposta para preenchimento foram “Conforme” (C), quando o estabelecimento atendeu ao item observado, “Não Conforme” (NC), quando o mesmo apresentou não conformidade e os itens que não eram aplicáveis receberam a denominação “Não se aplica” (NA).

O check list foi preenchido por meio de observações no próprio local e informações fornecidas pelas diretoras ou responsáveis pela escola.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da pesquisa de *Salmonella* e da enumeração de coliformes totais, termotolerantes, *E.coli*, bolores e leveduras, *Staphylococcus*, *Bacillus cereus* e Clostrídios sulfito redutores encontram-se nas Tabelas de 1 a 21.

5.1 Coliformes totais

Os resultados para a pesquisa de coliformes totais estão apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3.

De acordo com os resultados encontrados nas Tabelas 1, 2 e 3 observamos que das 78 amostras analisadas 10 (12,8%) apresentaram contagens iguais ou superiores a 460 NMP/g, utilizado como ponto de comparação devido a ausência de padrão estabelecido pela legislação (em destaque nas tabelas) de coliformes totais, onde 9 delas são de alimentos consumidos na sua forma in natura, sem nenhum cozimento, como nas saladas. De acordo com Keeratipibul (2010) o aumento de surtos de doenças ligadas a alimentos está associado com o consumo de alimentos frescos como frutas e vegetais. Podemos observar também que a escola II é a que mais possui amostras com contagens elevadas.

Os coliformes totais são facilmente destruídos pelo calor, portanto sua presença em alimentos que passaram pelo processo de cozimento indica uma contaminação pós processamento demonstrando que não foram aplicadas corretamente as BPF. Quatro amostras que passaram pelo processo de cozimento apresentaram contagens superiores a 240 NMP/g.

Ao realizarmos a comparação entre as 3 escolas, podemos observar que na escola I apenas 4% das amostras apresentaram contagens superiores a 460 NMP, na escola II foram 24% e na escola III 12% das amostras.

Das 78 amostras analisadas nas 3 escolas, 6 (7,7%) apresentaram contagens iguais ou superiores a 1.100 NMP/g, indicando condições precárias de higiene.

Tabela 1. Resultados obtidos após determinação do NMP/g de coliformes totais na escola I.

| Coliformes totais (NMP/g) Escola I | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|----------|------------------|----------|--------------------|----------|---------------------------|----------|------------------|----------|-------------------|----------|
| Amostras | 18/08/10 | Amostras | 30/08/10 | Amostras | 23/09/10 | Amostras | 01/10/10 | Amostras | 21/02/11 | Amostras | 02/03/11 |
| Arroz | < 3 | Arroz | < 3 | Arroz | < 3 | Arroz | < 3 | Arroz | < 3 | Arroz | < 3 |
| Feijão | < 3 | Feijão | < 3 | Feijão | < 3 | Feijão | < 3 | Feijão | < 3 | Feijão | < 3 |
| Carne com batatas | < 3 | Omelete | < 3 | Frango com legumes | < 3 | Carne com legumes | 20 | Ovo | < 3 | Carne em tirinhas | < 3 |
| Agrião com tomate | 28 | Salada de tomate | 9 | Salada de Alface | 460 | Alface com cenoura | 150 | Salada de tomate | < 3 | Salada | 4 |
| | | Abobrinha | < 3 | | | | | Chuchu | < 3 | Purê | < 3 |
| Padrão Federal Brasil 2001 | | | | | | Ausência de padrão | | | | | |

Tabela 2. Resultados obtidos após determinação do NMP/g de coliformes totais na escola II.

| Coliformes totais (NMP/g) Escola II | | | | | | | | | | | |
|--|----------|------------------|----------|-----------------|----------|---------------------------|----------|------------------|----------|-------------------|----------|
| Amostras | 30/08/10 | Amostras | 08/09/10 | Amostras | 23/09/10 | Amostras | 18/10/10 | Amostras | 03/03/11 | Amostras | 14/03/11 |
| Arroz | < 3 | Arroz | < 3 | Arroz | < 3 | Arroz | 11 | Arroz | 240 | Arroz | 15 |
| Feijão | < 3 | Feijão | < 3 | Feijão | < 3 | Feijão | 120 | Feijão | 9 | Feijão | < 3 |
| Carne de panela | < 3 | Omelete | < 3 | Frango | < 3 | Frango refogado | 43 | Carne | 240 | Carne em tirinhas | 460 |
| Acelga com tomate | >1.100 | Salada de alface | 240 | Salada colorida | 43 | Salada colorida | >1.100 | Salada de alface | 1.100 | Salada | 460 |
| | | | | | | | | Purê | >1.100 | | |
| Padrão Federal Brasil 2001 | | | | | | Ausência de padrão | | | | | |

Tabela 3. Resultados obtidos após determinação do NMP/g de coliformes totais na escola III.

| Coliformes totais (NMP/g) Escola III | | | | | | | | | | | |
|---|----------|------------------|----------|--------------------|----------|--------------------|----------|---------------------|----------|------------------|----------|
| Amostras | 18/08/10 | Amostras | 08/09/10 | Amostras | 01/10/10 | Amostras | 18/10/10 | Amostras | 22/02/11 | Amostras | 14/03/11 |
| Arroz | 7 | Arroz | < 3 | Arroz | < 3 | Arroz | < 3 | Arroz | < 3 | Arroz | < 3 |
| Feijão | 3 | Feijão | < 3 | Feijão | 7 | Feijão | 3 | Feijão | < 3 | Feijão | < 3 |
| Carne com mandioca | < 3 | Carne de panela | < 3 | Carne com legumes | 7 | Carne moída | 11 | Carne | < 3 | Carne | < 3 |
| Couve flor cozida | < 3 | Salada de alface | 460 | Alface com cenoura | 1.100 | Salada de alface | 1.100 | Salada de beterraba | < 3 | Salada de alface | 93 |
| Farofa | < 3 | Farofa | < 3 | | | | | | | | |
| Padrão Federal Brasil 2001 | | | | | | Ausência de padrão | | | | | |

5.2 Coliformes termotolerantes

Assim como os coliformes totais, os coliformes termotolerantes também são indicadores da qualidade higiênico-sanitária do produto. Os resultados encontrados estão apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6.

Em relação a RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, apenas uma amostra (1,3%) (em destaque na tabela) das 78 analisadas estava fora dos padrões quanto aos coliformes termotolerantes. As outras 77 amostras estavam dentro dos padrões. Da mesma forma Costa et al. (2008) também não encontraram contagens superiores às permitidas em nenhuma amostra de merenda escolar servida em um colégio estadual de Sobral no Ceará.

A amostra que estava fora do padrão era de carne, onde foi encontrada uma contagem de 39 NMP/g, quando o permitido pela legislação para esse tipo de alimento é de apenas 20 NMP/g. Passos et al. (2008) também encontraram em amostras de carne assada de um restaurante de uma empreiteira de construção civil contagens de 28 NMP/g, estando fora do padrão estabelecido.

Foi detectado a presença de coliformes termotolerantes em 14 das 78 amostras, onde 11% das amostras pertenciam a escola I, 20% pertenciam a escola II e 23% a escola III. A escola II foi a única que apresentou amostras fora do padrão, para este indicador.

De acordo com Passos et al. (2008) essas bactérias isoladas em alimentos prontos para consumo podem provocar surtos de intoxicação alimentar, além de caracterizarem os produtos como impróprios para consumo.

A presença de coliformes termotolerantes deve ser avaliada com cuidado, uma vez que pode estar presente *E. coli* patogênica, que pode causar surtos alimentares.

Tabela 4. Resultados obtidos após determinação do NMP/g de coliformes termotolerantes na escola I.

| Coliformes Termotolerantes (NMP/g) Escola I | | | | | | | | | | | |
|--|----------|------------------|----------|--------------------|----------|--------------------|----------|------------------|----------|-------------------|----------|
| Amostras | 18/08/10 | Amostras | 30/08/10 | Amostras | 23/09/10 | Amostras | 01/10/10 | Amostras | 21/02/11 | Amostras | 02/03/11 |
| Arroz | < 3 | Arroz | < 3 | Arroz | < 3 | Arroz | < 3 | Arroz | < 3 | Arroz | < 3 |
| Feijão | < 3 | Feijão | < 3 | Feijão | < 3 | Feijão | < 3 | Feijão | < 3 | Feijão | < 3 |
| Carne com batatas | < 3 | Omelete | < 3 | Frango com legumes | < 3 | Carne com legumes | 3 | Ovo | < 3 | Carne em tirinhas | < 3 |
| Agrião com tomate | < 3 | Salada de tomate | < 3 | Salada de Alface | 4 | Alface com cenoura | 9 | Salada de tomate | < 3 | Salada | < 3 |
| | | Abobrinha | < 3 | | | | | Chuchu | < 3 | Purê | < 3 |
| Padrão Federal Brasil 2001 | | | | | | | | | | | |
| 10² NMP/g 2x10 NMP/g para carnes assadas e cozidas | | | | | | | | | | | |

Tabela 6. Resultados obtidos após determinação do NMP/g de coliformes termotolerantes na escola III.

| Coliformes termotolerantes (NMP/g) Escola III | | | | | | | | | | | |
|---|----------|------------------|----------|--------------------|----------|------------------|----------|---------------------|----------|------------------|----------|
| Amostras | 18/08/10 | Amostras | 08/09/10 | Amostras | 01/10/10 | Amostras | 18/10/10 | Amostras | 22/02/11 | Amostras | 14/03/11 |
| Arroz | < 3 | Arroz | < 3 | Arroz | < 3 | Arroz | < 3 | Arroz | < 3 | Arroz | < 3 |
| Feijão | < 3 | Feijão | < 3 | Feijão | < 3 | Feijão | 3 | Feijão | < 3 | Feijão | < 3 |
| Carne com mandioca | < 3 | Carne de panela | < 3 | Carne com legumes | 3 | Carne moída | 3 | Carne | < 3 | Carne | < 3 |
| Couve flor cozida | < 3 | Salada de alface | < 3 | Alface com cenoura | 9 | Salada de alface | 39 | Salada de beterraba | < 3 | Salada de alface | 93 |
| Farofa | < 3 | Farofa | < 3 | | | | | | | | |
| Padrão Federal Brasil 2001 | | | | | | | | | | | |
| 10² NMP/g 2x10 NMP/g para carnes assadas ou cozidas | | | | | | | | | | | |

5.3 Pesquisa de *E. coli*

Podemos observar os resultados encontrados na pesquisa de *E. coli* na Tabela 7. Em destaque as amostras que não atendem ao padrão.

Tabela 7. Resultados obtidos após pesquisa da presença de *E. coli* nas escolas I, II e III.

| <i>E. coli</i> | | | |
|-----------------------------------|--------|-----------------|---------------------------------------|
| Amostra | Escola | Termotolerantes | <i>E. coli</i> |
| Salada de alface | I | 4 NMP/g | Presente |
| Carne com legumes | I | 3 NMP/g | Ausente |
| Alface com cenoura | I | 9 NMP/g | Ausente |
| Salada de acelga com tomate | II | 20 NMP/g | Presente |
| Arroz | II | 4 NMP/g | Presente |
| Feijão | II | 11 NMP/g | Ausente |
| Carne em tiras | II | 39 NMP/g | Ausente |
| Salada | II | 28 NMP/g | Ausente |
| Carne legumes | III | 3 NMP/g | Presente |
| Salada de alface com cenoura | III | 9 NMP/g | Ausente |
| Feijão | III | 3 NMP/g | Ausente |
| Carne moída com milho | III | 3 NMP/g | Ausente |
| Salada de alface | III | 39 NMP/g | Presente |
| Salada de Alface | III | 93 NMP/g | Ausente |
| Padrão Federal Brasil 2001 | | | Ausência deste micro-organismo |

Das 14 amostras deste estudo que apresentaram coliformes termotolerantes, 5 (35,7%) foram positivas para *E. coli*, confirmada pelos testes bioquímicos. Estas amostras estão fora dos padrões estabelecidos pela legislação BRASIL, 2001, que preconiza como padrão a ausência desse micro-organismo.

Vieira et al. (2005) encontraram *E.coli* em amostras de carnes “in natura” na merenda escolar servida nas escolas estaduais de Minas Gerais. Cardoso et al. (2010) também encontraram *E.coli* em amostras de merenda escolar analisadas em escolas de Salvador- BA.

Quando comparamos as e escolas podemos observar que a escola I apresentou uma amostra com a presença deste micro-organismo, a escola II e a escola III apresentaram duas amostras positivas.

Apesar de *E. coli* ser um habitante normal do trato intestinal de animais e exercer um efeito benéfico sobre o organismo suprimindo a multiplicação de bactérias prejudiciais e sintetizando uma considerável quantidade de vitaminas, há cepas como as *E.coli* enteropatogênicas capazes de provocar doença. Essas cepas ocupam hoje o segundo lugar entre os principais agentes de doenças de origem alimentar nos Estados Unidos (SILVA et al., 2003).

De acordo com a legislação, esses alimentos deveriam ser considerados impróprios para o consumo, porém, ao invés disso, foram destinados à alimentação de crianças, podendo provocar doenças. Esses resultados sugerem um maior cuidado com a manipulação e com a matéria-prima utilizada na merenda, uma vez que 3 das 5 amostras positivas para *E.coli* eram de saladas, que serão consumidas na sua forma “in natura”.

5.4 Bolores e leveduras

Não há padrões na legislação brasileira para contagem de bolores e leveduras em alimentos prontos para consumo, sendo assim será utilizada para realização de comparações o padrão estabelecido pela Resolução RDC 12 de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA (BRASIL, 2001) para geléias e doces em pasta, que permite uma contagem até 10^4 UFC/g.

Foi realizada a pesquisa destes micro-organismos, pois indicam as condições sanitárias em que o alimento foi preparado e possuem a capacidade de produzir micotoxinas, portanto contagens elevadas devem ser evitadas.

Os resultados da pesquisa de bolores e leveduras deste estudo encontram-se nas Tabelas de 8 a 10.

Das 78 amostras analisadas 5 (6,4%) (em destaque nas tabelas) apresentaram contagens superiores a 10^4 UFC/g. Esta contagem é considerada alta, pois entre estes micro-organismos podemos encontrar aqueles que são produtores de micotoxinas.

Ao compararmos as 3 escolas podemos observar que 100% das amostras das escolas I e III apresentaram contagens inferiores a 10^4 e 20% das amostras da escola II, apresentaram contagens superiores a 10^4 UFC.

Mariutti; Valente Soares (2009) ao pesquisarem a presença de micotoxinas em produtos a base de tomates (frutos altamente susceptíveis à contaminação fúngica), comercializados no Brasil, não encontram níveis detectáveis em nenhuma das 63 amostras analisadas.

Ao contrário em estudo de feijão, Costa; Scussel (2002) encontraram uma contagem média de fungos filamentosos de 2.8×10^3 UFC para feijão preto e 6.7×10^3 UFC para outros tipos de feijão. Desses, 24.6% do feijão preto e 22.1% dos outros tipos apresentaram fungos toxigênicos.

Caldas et al (2002) pesquisaram micotoxinas em alimentos e encontraram níveis de aflatoxina em 19.6 % das amostras, estando entre elas amendoim, milho para pipoca, milho em grão e castanha do Pará.

A legislação BRASIL (2001) não estabelece padrões máximos para alimentos prontos para consumo, porém estes resultados indicam que deve haver um controle maior em relação a bolores e leveduras.

Tabela 8. Resultados obtidos após contagem das UFC/g de bolores e leveduras na escola I.

| Bolores e leveduras UFC/g Escola I | | | | | | | | | | | |
|---|---------------------|------------------|---------------------|--------------------|-------------------|---------------------------|---------------------|------------------|-----------------|-------------------|---------------------|
| Amostras | 18/08/10 | Amostras | 30/08/10 | Amostras | 23/09/10 | Amostras | 01/10/10 | Amostras | 21/02/11 | Amostras | 02/03/11 |
| Arroz | < 100 | Arroz | < 100 | Arroz | < 100 | Arroz | 6x10 ² | Arroz | 10 ² | Arroz | 4x10 ² |
| Feijão | 10 ² | Feijão | < 100 | Feijão | < 100 | Feijão | 1,5x10 ² | Feijão | < 100 | Feijão | 3,5x10 ² |
| Carne com batatas | 2x10 ² | Omelete | < 100 | Frango com legumes | 10 ² | Carne com legumes | 2x10 ² | Ovo | 10 ² | Carne em tirinhas | 1,5x10 ² |
| Agrião com tomate | 1,9x10 ³ | Salada de tomate | 4,5x10 ² | Salada de Alface | 5x10 ³ | Alface com cenoura | 5,8x10 ³ | Salada de tomate | 10 ² | Salada | 6x10 ² |
| | | Abobrinha | < 100 | | | | | Chuchu | 10 ² | Purê | 10 ² |
| Padrão Federal Brasil 2001 | | | | | | Ausência de padrão | | | | | |

Tabela 9. Resultados obtidos após contagem das UFC/g de bolores e leveduras na escola II.

| Bolores e Leveduras UFC/g Escola II | | | | | | | | | | | |
|--|---------------------|------------------|---------------------|-----------------|---------------------|---------------------------|---------------------|------------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| Amostras | 30/08/10 | Amostras | 08/09/10 | Amostras | 23/09/10 | Amostras | 18/10/10 | Amostras | 03/03/11 | Amostras | 14/03/11 |
| Arroz | < 100 | Arroz | < 100 | Arroz | < 100 | Arroz | 1,5x10 ² | Arroz | 10 ² | Arroz | 5,1x10 ³ |
| Feijão | 2,2x10 ³ | Feijão | < 100 | Feijão | 1,5x10 ² | Feijão | 10 ² | Feijão | 2x10 ² | Feijão | 10 ² |
| Carne de panela | < 100 | Omelete | 10 ² | Frango | < 100 | Frango refogado | 10 ² | Carne | 7x10 ² | Carne em tirinhas | 8,7x10 ³ |
| Acelga com tomate | 1,5x10 ⁵ | Salada de alface | 5,8x10 ⁴ | Salada colorida | 4,6x10 ³ | Salada colorida | 4,1x10 ⁴ | Salada de alface | 2x10 ⁴ | Salada | 8,4x10 ⁴ |
| | | | | | | | | Purê | 1,7x10 ³ | | |
| Padrão Federal Brasil 2001 | | | | | | Ausência de padrão | | | | | |

Tabela 10. Resultados obtidos após contagem das UFC/g de bolores e leveduras na escola III.

| Bolores e leveduras UFC/g Escola III | | | | | | | | | | | |
|---|-----------------|------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|-------------------|------------------|---------------------|
| Amostras | 18/08/10 | Amostras | 08/09/10 | Amostras | 01/10/10 | Amostras | 18/10/10 | Amostras | 22/02/11 | Amostras | 14/03/11 |
| Arroz | 10 ² | Arroz | < 100 | Arroz | 10 ² | Arroz | < 100 | Arroz | < 100 | Arroz | 1,5x10 ² |
| Feijão | < 100 | Feijão | < 100 | Feijão | 4,8x10 ³ | Feijão | 10 ² | Feijão | < 100 | Feijão | < 100 |
| Carne com mandioca | < 100 | Carne de panela | < 100 | Carne com legumes | 4,5x10 ² | Carne moída | 3,5x10 ² | Carne | < 100 | Carne | < 100 |
| Couve flor cozida | 10 ² | Salada de alface | 2,1x10 ³ | Alface com cenoura | 3,6x10 ³ | Salada de alface | 4,5x10 ³ | Salada de beterraba | 4x10 ² | Salada de alface | 5,5x10 ² |
| Farofa | < 100 | Farofa | < 100 | | | | | | | | |
| Padrão Federal Brasil 2001 | | | | | | Ausência de padrão | | | | | |

5.5 *Staphylococcus* coagulase positiva

A Resolução RDC 12 de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA (BRASIL, 2001) traz como padrão para alimentos apenas a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, porém realizamos também a contagem dos coagulase negativa, uma vez que estudos tem demonstrado que cepas coagulase negativa podem possuir genes toxigênicos. De acordo com Freitas et al. (2009) a ocorrência de vários genes toxigênicos em amostras de *Staphylococcus* coagulase negativa é um fato importante devido a inexistência no Brasil de uma legislação que determine o limite desses micro-organismos no alimento.

Os resultados obtidos na pesquisa de *Staphylococcus* estão expostos nas Tabelas de 11 a 13. Os resultados foram divididos em contagem de *Staphylococcus* total (T) e esta foi dividida em coagulase positiva que foi representada pelo sinal (+) e coagulase negativa representada pelo sinal (-).

Em relação à contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, que é aquela que a ANVISA estabelece padrão, apenas uma (1,3%) amostra (em destaque na tabela) apresentou contagem superior a 10^3 , estando as outras 77 amostras dentro do padrão legal.

A escola I apresentou 25% das amostras analisadas com contagens maiores que 10^2 , onde 21% pertenciam a cepas coagulase negativas e 4% a cepas coagulase positiva. A escola II obteve 48% das suas amostras com contagens superiores a 10^2 onde 36% pertenciam a cepas coagulase negativa e 12% a cepas coagulase positiva. A escola III apresentou 23% das suas amostras com contagens superiores a 10^2 , onde 19% pertenciam a cepas coagulase negativa e 4% a cepas coagulase positiva.

Estudos realizados por Vieira et al. (2005) e Passos et al. (2008) ao analisarem amostras de comida processada encontraram todas as amostras dentro dos padrões estabelecidos. Faustino et al. (2007) ao analisarem amostras envolvidas em surtos alimentares encontraram 2 com contagens elevadas de *Staphylococcus* coagulase positiva. Recentemente Huong et al (2010) encontrou *S. aureus* em 21,8% das amostras de carne de porco grelhada recolhidas de vendedores ambulantes e estabelecimentos comerciais no Vietnã, ressaltando a importância de um controle mundial.

Apesar da legislação não apresentar padrão de *Staphylococcus* para saladas, foi realizada a pesquisa deste micro-organismo no estudo, pois de acordo com Neto, Silva e Stamford (2002) alimentos que sofrem manipulação são potencialmente capazes de

causar intoxicação estafilocócica e as saladas são altamente manipuladas não passando por processo de cocção. Ao observarmos os resultados obtidos podemos verificar que 16 (94,1%) das 17 amostras de salada cruas estudadas este micro-organismo estava presente.

Tabela 11. Resultados obtidos após contagem das UFC/g de *Staphylococcus spp* na escola I.

| <i>Staphylococcus spp</i> UFC/g | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------------|------------------|-----------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|---------------------|------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|
| Escola I | | | | | | | | | | | |
| Amostras | 18/08/10 | Amostras | 30/08/10 | Amostras | 23/09/10 | Amostras | 01/10/10 | Amostras | 21/02/11 | Amostras | 02/03/11 |
| Arroz | T. < 100 | Arroz | T. < 100 | Arroz | T. < 100 | Arroz | T. < 100 | Arroz | T. < 100 | Arroz | T. < 100 |
| Feijão | T. < 100 | Feijão | T. < 100 | Feijão | T. < 100 | Feijão | T. < 100 | Feijão | T. < 100 | Feijão | T. < 100 |
| Carne com batatas | T. < 100 | Omelete | T. < 100 | Frango com legumes | T. < 100 | Carne com legumes | T. < 100 | Ovo | T. < 100 | Carne em tirinhas | T. < 100 |
| Agrião com tomate | T. 2.5x10 ² | Salada de tomate | T. 3x10 ² | Salada de Alface | T. 1,2x10 ³ | Alface com cenoura | T. 10 ³ | Salada de tomate | T. 2x10 ² | Salada | T. 2x10 ² |
| | (-) 2.5x10 ² | | (-) 10 ² | | (-) 1,2x10 ³ | | (-) 10 ³ | | (-) 2x10 ² | | (-) 2x10 ² |
| | (+) ——— | | (+) 2x10 ² | | (+) ——— | | (+) ——— | | (+) ——— | | (+) ——— |
| | | Abobrinha | T. < 100 | | | | | Chuchu | T. < 100 | Purê | T. < 100 |
| Padrão Federal Brasil 2001 | | | | | | | | | | | |
| 10³ UFC/g | | | | | | | | | | | |

Tabela 12. Resultados obtidos após contagem das UFC/g de *Staphylococcus* spp. na escola II.

| <i>Staphylococcus</i> spp. UFC/g Escola II | | | | | | | | | | | |
|---|--|------------------|--|-----------------|--|-----------------|--|------------------|--|-----------------------------|--|
| Amostras | 30/08/10 | Amostras | 08/09/10 | Amostras | 23/09/10 | Amostras | 18/10/10 | Amostras | 03/03/11 | Amostras | 14/03/11 |
| Arroz | T. < 100 | Arroz | T. < 100 | Arroz | T. < 100 | Arroz | T. < 100 | Arroz | T. < 100 | Arroz | T. 10 ² (-) 10 ² (+) - |
| Feijão | T. < 100 | Feijão | T. < 100 | Feijão | T. < 100 | Feijão | T. < 100 | Feijão | T. < 100 | Feijão | T. 10 ² (-) 10 ² (+) - |
| Carne de panela | T. < 100 | Omelete | T. < 100 | Frango | T. 10 ² (-) 10 ² (+) _____ | Frango refogado | T. < 100 | Carne | T. 2x10 ² (-) 10 ² (+) 10 ² | Carne em tirinhas | T. 10 ² (-) 10 ² (+) - |
| Acelga com tomate | T. 1,5x10 ⁴ (-) 1,5x10 ⁴ (+) _____ | Salada de alface | T. 2,5x10 ² (-) 2,5x10 ² (+) _____ | Salada colorida | T. 2x10 ² (-) 2x10 ² (+) _____ | Salada colorida | T. 5x10 ³ (-) 5x10 ³ (+) _____ | Salada de alface | T. 10 ⁴ (-) 9x10 ³ (+) 10 ³ | Salada | T. 7x10 ² (-) 7x10 ² (+) _____ |
| | | | | | | | | Purê | T. 8,5x10 ³ (-) 6,8x10 ³ (+) 1,7x10 ³ | | |
| Padrão Federal Brasil 2001 | | | | | | | | | | 10³ UFC/g | |

Tabela 13. Resultados obtidos após contagem das UFC/g de *Staphylococcus* spp. na escola III.

| <i>Staphylococcus</i> spp. UFC/g Escola III | | | | | | | | | | | |
|--|-----------------------|------------------|--------------------|--------------------|----------------------|------------------|----------------------|---------------------|--------------------|------------------|----------|
| Amostras | 18/08/10 | Amostras | 08/09/10 | Amostras | 01/10/10 | Amostras | 18/10/10 | Amostras | 22/02/11 | Amostras | 14/03/11 |
| Arroz | T. $3,5 \times 10^2$ | Arroz | T. < 100 | Arroz | T. < 100 | Arroz | T. < 100 | Arroz | T. < 100 | Arroz | T. < 100 |
| | (-) $1,5 \times 10^2$ | | | | | | | | | | |
| | (+) $1,5 \times 10^2$ | | | | | | | | | | |
| Feijão | T. $4,5 \times 10^2$ | Feijão | T. < 100 | Feijão | T. < 100 | Feijão | T. < 100 | Feijão | T. < 100 | Feijão | T. < 100 |
| | (-) $3,5 \times 10^2$ | | | | | | | | | | |
| | (+) 10^2 | | | | | | | | | | |
| Carne com mandioca | T. < 100 | Carne de panela | T. < 100 | Carne com legumes | T. $1,5 \times 10^2$ | Carne moída | T. < 100 | Carne | T. 2×10^2 | Carne | T. < 100 |
| | (-) $1,5 \times 10^2$ | | | | | | | | | | |
| | (+) - | | | | | | | | | | |
| Couve flor cozida | T. < 100 | Salada de alface | T. 8×10^2 | Alface com cenoura | T. $9,5 \times 10^2$ | Salada de alface | T. $1,4 \times 10^3$ | Salada de beterraba | T. 9×10^2 | Salada de alface | T. < 100 |
| | (-) 6×10^2 | | | | | | | | | | |
| | (+) 2×10^2 | | | | | | | | | | |
| Farofa | T. 2×10^2 | Farofa | T. 10^2 | | (+) - | | | | | | |
| | (-) 2×10^2 | | | | | | | | | | |
| | (+) - | | | | | | | | | | |
| Padrão Federal Brasil 2001 | | | | | | | | | | | |
| 10^3 UFC/g | | | | | | | | | | | |

5.6 *Salmonella* spp.

Nas 78 amostras analisadas neste estudo, não foi encontrada *Salmonella* em nenhuma, estando todas elas dentro do padrão preconizado pela RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, que estabelece ausência desse micro-organismo em 25g do produto (BRASIL, 2001).

Costa et al. (2008), analisando alimentos da merenda escolar em uma cidade do Ceará, também obtiveram ausência em todas as amostras. Ao contrário, Kaku et al. (1995) isolaram *Salmonella* Enteritidis em patê de batatas à base de ovos crus oferecido aos alunos em uma escola no município de Pontalinda-SP.

A maioria dos surtos é causada pela ingestão de alimentos preparados à base de ovos crus ou mal cozidos. Dos 23 surtos pesquisados por Peresi et al. (1998) causados por *Salmonella* ocorridos nas cidades do interior de São Paulo a grande maioria estava associada ao consumo de alimentos contendo ovos, sobretudo crus ou mal cozidos.

Provavelmente este micro-organismo não foi encontrado em nenhum dos alimentos envolvidos nesta pesquisa, devido ao fato de não haver preparados à base de ovos crus ou mal cozidos, e também as carnes de frango estarem sempre bem cozidas.

5.7 *Bacillus cereus*

Os resultados obtidos da contagem de *Bacillus cereus*, encontram-se nas Tabelas 14 a 16.

Foram analisadas 65 amostras neste estudo e todas elas estavam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente (BRASIL, 2001) apresentando contagens inferiores a 10^3 UFC/g. Passos et al. (2008) também não encontraram nenhuma amostra analisada fora do padrão ao investigar surto de toxiinfecção alimentar ocorrido entre funcionários de uma empreiteira. Já Reyes et al. (2007) ao investigar a prevalência deste agente no leite em pó e produtos derivados utilizados em escolas chilenas encontraram esporos em 84% das amostras, sendo que a maior incidência era naquelas com arroz integral em sua formulação.

Foi detectado a presença deste micro-organismo em 14% das amostras das escolas I, II e III, porém em contagens permitidas pela legislação.

Mendes et al. (2004) e Soraes et al. (2008) encontram *Bacillus cereus* em bancadas de unidades de alimentação e restaurantes, sugerindo que as condições de higiene das bancadas eram deficientes, podendo essa contaminação ser levada ao alimento. Por ser uma bactéria esporulada, abundantemente encontrada no meio ambiente e devido ao fato dos alimentos estarem frequentemente expostos a temperatura ambiente por tempo prolongado e as inadequadas condições de higiene da bancada e equipamento torna-se necessário o aprimoramento dos procedimentos de higienização de forma a evitar a contaminação cruzada dos alimentos (SOARES et al, 2008).

Tabela 14. Resultados obtidos após contagem das UFC/g de *Bacillus cereus* na escola I

| <i>Bacillus cereus</i> UFC/g Escola I | | | | | | | | | | | |
|--|----------|-----------|----------|--------------------|-----------------|-----------------------------|----------|----------|----------|-------------------|----------|
| Amostras | 18/08/10 | Amostras | 30/08/10 | Amostras | 23/09/10 | Amostras | 01/10/10 | Amostras | 21/02/11 | Amostras | 02/03/11 |
| Arroz | < 100 | Arroz | < 100 | Arroz | < 100 | Arroz | < 100 | Arroz | < 100 | Arroz | < 100 |
| Feijão | < 100 | Feijão | < 100 | Feijão | 10 ² | Feijão | < 100 | Feijão | < 100 | Feijão | < 100 |
| Carne com batatas | < 100 | Omelete | < 100 | Frango com legumes | 10 ² | Carne com legumes | < 100 | Ovo | < 100 | Carne em tirinhas | < 100 |
| | | Abobrinha | < 100 | | | | | Chuchu | < 100 | Purê | < 100 |
| Padrão Federal Brasil 2001 | | | | | | 10³ UFC/g | | | | | |

Tabela 15. Resultados obtidos após contagem das UFC/g de *Bacillus cereus* na escola II.

| <i>Bacillus cereus</i> UFC/g Escola II | | | | | | | | | | | |
|---|----------|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------|-----------------|----------|----------|----------|-------------------|----------|
| Amostras | 30/08/10 | Amostras | 08/09/10 | Amostras | 23/09/10 | Amostras | 18/10/10 | Amostras | 03/03/11 | Amostras | 14/03/11 |
| Arroz | < 100 | Arroz | < 100 | Arroz | < 100 | Arroz | < 100 | Arroz | < 100 | Arroz | < 100 |
| Feijão | < 100 | Feijão | < 100 | Feijão | < 100 | Feijão | < 100 | Feijão | < 100 | Feijão | < 100 |
| Carne de panela | < 100 | Omelete | 10 ² | Frango | < 100 | Frango refogado | < 100 | Carne | < 100 | Carne em tirinhas | < 100 |
| | | Salada de colorida | | Salada de colorida | 10 ² | Salada colorida | < 100 | Purê | < 100 | Salada | < 100 |
| Padrão Federal Brasil 2001 | | | | | | | | | | | |
| 10³ UFC/g | | | | | | | | | | | |

Tabela 16. Resultados obtidos após contagem das UFC/g de *Bacillus cereus* na escola III.

| <i>Bacillus cereus</i> UFC/g Escola III | | | | | | | | | | | |
|--|----------|-----------------|----------|-------------------|-----------------|-------------|----------|---------------------|----------|----------|-------------------|
| Amostras | 18/08/10 | Amostras | 08/09/10 | Amostras | 01/10/10 | Amostras | 18/10/10 | Amostras | 22/02/11 | Amostras | 14/03/11 |
| Arroz | < 100 | Arroz | < 100 | Arroz | < 100 | Arroz | < 100 | Arroz | < 100 | Arroz | $1,5 \times 10^2$ |
| Feijão | < 100 | Feijão | 10^2 | Feijão | 4×10^2 | Feijão | < 100 | Feijão | < 100 | Feijão | < 100 |
| Carne com mandioca | < 100 | Carne de panela | < 100 | Carne com legumes | < 100 | Carne moída | < 100 | Carne | < 100 | Carne | < 100 |
| Couve flor cozida | < 100 | Farofa | < 100 | | | | | Salada de beterraba | < 100 | | |
| Farofa | < 100 | | | | | | | | | | |
| Padrão Federal Brasil 2001 | | | | | | | | | | | |
| 10^3 UFC/g | | | | | | | | | | | |

5.8 Clostrídios sulfito redutores

Os resultados obtidos neste estudo para clostrídios sulfito redutores encontram-se na Tabela 17.

Todas as amostras (15) analisadas neste estudo encontravam-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2001) que preconiza contagens inferiores a 10^3 UFC/g. Passos et al. (2008) também encontraram suas análises dentro dos padrões para esse micro-organismo.

Não foi detectada a presença deste micro-organismo em nenhuma das amostras das 3 escolas pesquisadas, este fato pode ser devido as carnes terem sido muito bem cozidas, e armazenadas sob refrigeração rapidamente, não ficando expostas a temperatura ambiente por tempo prolongado, evitando assim a contaminação e proliferação.

Berjón et al. (2003), após investigarem um surto ocorrido em uma escola perto de Madrid onde foi servido cozido e sopa, encontraram nas fezes das crianças acometidas a presença de enterotoxina de *C. perfringens*, sugerindo ser este o agente do surto.

Acreditava-se que a grande fonte de contaminação dos alimentos eram os animais, porém Lindstrom et al. (2011), afirmam que este conceito deve ser revisto, pois humanos podem servir como uma importante fonte. Sendo assim manipuladores portadores deste micro-organismo poderiam contaminar os alimentos.

Tabela 17. Resultados obtidos após contagem das UFC/g de Clostrídios sulfito redutores nas escolas I, II e III.

| Clostrídios sulfito redutores (UFC/g) | | | |
|--|-------------|---------------|---------------------------|
| Amostra | Data | Escola | UFC/g |
| Carne com batatas | 18.08.10 | I | < 10 |
| Frango com legumes | 23.09.10 | I | < 10 |
| Carne com legumes | 01.10.10 | I | < 10 |
| Carne | 02.03.11 | I | < 10 |
| Carne de Panela | 30.08.10 | II | < 10 |
| Frango | 23.09.10 | II | < 10 |
| Frango refogado | 18.10.10 | II | < 10 |
| Rocambole de carne | 03.03.11 | II | < 10 |
| Carne | 14/03/11 | II | < 10 |
| Carne com mandioca | 18.08.10 | III | <10 |
| Carne de panela | 08.09.10 | III | <10 |
| Carne com legumes | 01.10.10 | III | < 10 |
| Carne moída com milho | 18.10.10 | III | < 10 |
| Carne | 22.02.11 | III | < 10 |
| Carne | 14.03.11 | III | < 10 |
| Padrão Federal Brasil 2001 | | | 10³ UFC |

5.9 Análise de água

Inicialmente foram analisadas 11 amostras de água, sendo 3 de uma escola e 8 das outras 2 escolas, sendo 4 de cada uma. Na segunda etapa de coleta foram realizadas mais 2 coletas em cada escola, sendo que na escola I foram coletadas apenas mais 2 amostras pois a escola apresentava apenas torneira com água vinda da caixa, e nas escolas II e III foram coletadas mais 4 amostras cada, sendo 2 amostras da caixa d'água e 2 da água vinda diretamente da rua, totalizando 21 amostras analisadas. Os resultados encontram-se nas Tabelas 18 a 20.

Tabela 18. Análise de água na escola I

| Análise de água Escola I | | | |
|-------------------------------------|-------------|--|--------------------------|
| Amostra | Data | Contagem heterotróficos | Coliformes totais |
| Caixa | 18.08.10 | 7 UFC/mL | < 2 NMP/100mL |
| Caixa | 30.08.10 | 8 UFC/mL | < 2 NMP/100mL |
| Caixa | 23.09.10 | 2 UFC/mL | < 2 NMP/100mL |
| Caixa | 01.10.10 | 2 UFC/mL | < 2 NMP/100mL |
| Caixa | 21.02.11 | 2 UFC/mL | < 2 NMP/100mL |
| Caixa | 02.03.11 | 2 UFC/mL | < 2 NMP/100mL |
| Padrão Federal Brasil, 2004 | | 5×10^2 UFC/mL | Ausência em 100mL |

Tabela 19. Análise de água na escola II

| Análise de água Escola II | | | |
|--|-------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Amostra | Data | Contagem de heterotróficos | Coliformes totais |
| Caixa | 30.08.10 | 1,3x10 ³ UFC/mL | < 2 NMP/100mL |
| Caixa | 23.09.10 | 1,8x10 ² UFC/mL | < 2NMP/100mL |
| Caixa | 18.10.10 | 3x10 ³ UFC/mL | < 2 NMP/100mL |
| Caixa | 03.03.11 | 4 UFC/mL | < 2 NMP/100mL |
| Rua | 03.03.11 | 2 UFC/mL | < 2 NMP/100mL |
| Caixa | 14.03.11 | 2 UFC/mL | < 2 NMP/100mL |
| Rua | 14.03.11 | 2 UFC/mL | < 2 NMP/100mL |
| Padrão Federal Brasil, 2004 | | 5x10² UFC/mL | Ausência em 100mL |

Tabela 20. Análise de água na escola III

| Análise de água Escola III | | | | | |
|---------------------------------------|-------------|-----------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| Amostra | Data | Contagem de heterotróficos | Coliformes totais | Coliformes termotolerantes | E. coli |
| Caixa | 18.08.10 | 2 UFC/mL | < 2 NMP/100mL | - | - |
| Caixa | 08.09.10 | 7,2x10 ⁴ UFC/mL | < 2 NMP/100mL | - | - |
| Caixa | 01.10.10 | 4x10 ² UFC/mL | 6 NMP/100mL | 6 NMP/100mL | Presente |
| Caixa | 18.10.10 | 2,1x10 ³ UFC/mL | 6 NMP/100mL | 6 NMP/100mL | Presente |
| Caixa | 22.02.11 | 2,4x10 ³ UFC/mL | < 2 NMP/100mL | - | - |
| Rua | 22.02.11 | 4,1x10 ³ UFC/mL | < 2NMP/100mL | - | - |
| Caixa | 14.03.11 | 2,5x10 ⁴ UFC/mL | < 2NMP/100mL | - | - |
| Rua | 14.03.11 | 9,8x10 ² UFC/mL | < 2NMP/100mL | - | - |
| Padrão Federal Brasil, 2004 | | 5x10² UFC/mL | Ausência em 100mL | Ausência em 100mL | Ausência em 100mL |

Neste estudo para determinação na qualidade da água foram realizadas a contagem de bactérias heterotróficas e determinação do NMP de coliformes totais e termotolerantes.

Para contagem de bactérias heterotróficas, 8 das 21 amostras (em destaque nas tabelas) analisadas estavam fora do padrão estabelecido pela Portaria nº 518 de 25 de março de 2004, a qual estabelece os padrões microbiológicos para água de consumo humano, com contagens até 5x10² UFC/ml. Para coliformes totais, 2 (9,5%) das 21

amostras estavam fora do padrão estabelecido pela legislação BRASIL (2004), que preconiza ausência em 100 mL de água. As duas amostras que continham coliformes totais foram testadas também para presença de coliformes termotolerantes e *E.coli*, estando estes presentes nas duas amostras.

A escola I apresentou 100% das amostras dentro dos padrões estabelecidos para análise de água, a escola II apresentou 2 amostras fora do padrão para contagem de heterotróficos e a escola III apresentou 6 amostras fora do padrão para heterotróficos e 2 fora do padrão para coliformes totais, termotolerantes e presença de *E.coli*.

Soto et al. (2006) encontraram irregularidades em 90% das amostras analisadas na qualidade da água de poços rasos de escolas públicas em um município do interior de São Paulo. Da mesma maneira Almeida et al. (2009), ao investigarem a qualidade da água utilizada no preparo da merenda de escolar de Salvador, encontraram bactérias do grupo coliforme em 69,4% das amostras analisadas, valores bem superiores aos encontrados neste estudo, onde apenas 10% das amostras apresentaram presença de coliformes totais.

Nogueira et al. (2003) encontraram valores semelhantes a este estudo para bactérias do grupo coliforme, sendo que 171 das 1033 amostras de água tratada das comunidades urbanas e rurais da região de Maringá-PR estavam contaminadas.

Quando comparamos a água da caixa d'água, com aquela que vem diretamente na rua, se observarmos que na escola III que a diferença de contagem de bactérias heterotróficas chega a ser 100 vezes maior na água da caixa, indicando a necessidade de higienizações mais freqüentes.

Estes resultados atentam para o perigo de contaminação dos alimentos e utensílios, uma vez que a água é utilizada para preparo e higienização, inclusive de alimentos que serão servidos crus.

5.10 “Swab” de mão

Foram analisados “swabs” das mãos das cozinheiras, quanto a presença de coliformes totais, termotolerantes, *E.coli* e *Staphylococcus* total identificado com a letra (T), *Staphylococcus* coagulase negativa identificado com o símbolo (-) e *Staphylococcus* coagulase positiva identificado com o símbolo (+) e em uma segunda parte de pesquisa foi realizado contagem de bolores e leveduras.

Os “swabs” foram identificados com a data da coleta, letra (D) quando coletado da mão direita e letra (E) quando coletado da mão esquerda. Em escolas em que havia mais de um manipulador foi designado uma letra qualquer para diferenciá-los. Os resultados encontram-se nas Tabelas 21 a 23.

Foram analisadas neste estudo 29 amostras de 6 diferentes manipuladores. Três amostras apresentaram contagens superiores a 460 NMP para coliformes totais das quais duas pertenciam a escola I e uma a escola III, em 4 amostras foram quantificados coliformes termotolerantes onde duas eram da escola II e duas da escola III. Duas amostras foram positivas para *E. coli*, sendo uma da escola II e uma da escola III. Monteiro et al. (2001) ao analisarem mãos de manipuladores encontraram uma frequência maior de *E. coli*, estando esta presente em 55% das amostras.

Com relação à pesquisa de *Staphylococcus spp* (coagulase positiva e coagulase negativa) foram encontradas 10 (34,5%) amostras das 29 analisadas com contagens superiores a 10^3 UFC/ mão. Foi observada a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em 6 delas. Em análise semelhante Monteiro et al. (2001) encontraram positividade em 35% das amostras. Acco et al. (2003) ao analisarem a mucosa nasal de manipuladores também encontraram *Staphylococcus* em 30 % das amostras.

Foram analisadas 8 amostras na escola I, das quais foi detectado presença de *Staphylococcus spp* em 7, onde 100% apresentaram cepas coagulase negativa e 3 apresentaram presença de cepas coagulase positiva. Na escola II foram analisadas 8 amostras, nas quais foi detectado a presença deste micro-organismo em 100% das amostras, onde 2 apresentaram cepas coagulase positiva. Na escola III foram analisadas 15 amostras onde em 8 foi detectado a presença de cepas coagulase negativa e em 3 a presença de cepas coagulase positiva.

Com relação as amostras que apresentaram contagens superiores a 10^3 , 2 pertenciam a escola I, 5 pertenciam a escola II e 3 pertenciam a escola III.

Rall et al. (2010) ao analisarem “swabs” da cavidade nasal e das mãos de 82 manipuladores na cidade de Botucatu, encontram *Staphylococcus* coagulase negativa em 62 amostras, onde destas, 46,8% apresentava o gene para produção da enterotoxina. Nas outras 20 amostras foi encontrado *Staphylococcus* coagulase positiva, onde 19 das 20 cepas analisadas apresentavam o gene para produção de enterotoxina. Este estudo ressalta a importância da detecção das cepas coagulase negativa.

Em relação a pesquisa de bolores e leveduras, neste estudo 3 (18,8%) das 16 amostras analisadas apresentaram contagens superiores a 10^3 UFC/ mão, onde 2 amostras pertencem a escola II e uma a escola III.

Os manipuladores são uma peça importante na segurança alimentar e podem contribuir para transmissão de doenças, pois podem introduzir patógenos durante a produção, processamento, distribuição e manipulação dos alimentos, sendo necessário treinamento constante e boas práticas de higiene para evitar a transmissão de doenças (ACCO et al., 2003.)

Tabela 21: Resultados obtidos após análise do “swab” de mão de manipuladores da escola I

| Escola I | | | | |
|-----------------|---|--|---|--|
| Amostra | <i>Staphylococcus spp.</i> (UFC/mão) | Coliformes totais (NMP/mão) | Coliformes termotolerantes (NMP/mão) | Bolores e leveduras (UFC/mão) |
| 18.08.10 A D | T. < 100 | 21 | < 3 | - |
| 30.08.10 A D | T. 6×10^2 | 93 | < 3 | - |
| | (-) $5,4 \times 10^2$ | | | |
| | (+) 6×10 | | | |
| 23.09.10 A D | T. $4,9 \times 10^3$ | 1.100 | < 3 | - |
| | (-) $4,9 \times 10^3$ | | | |
| | (+) - | | | |
| 01.10.10 A D | T. 10^2 | 460 | < 3 | - |
| | (-) 10^2 | | | |
| | (+) - | | | |
| 21.02.11 A D | T. 5×10^2 | 9 | < 3 | 10^2 |
| | (-) 4×10^2 | | | |
| | (+) 10^2 | | | |
| 21.02.11 A E | T. 3×10^2 | < 3 | < 3 | 10^2 |
| | (-) 3×10^2 | | | |
| | (+) - | | | |
| 02.03.11 A D | T. 9×10^2 | 2 | < 3 | < 100 |
| | (-) 9×10^2 | | | |
| | (+) - | | | |
| 02.03.11 A E | T. 10^3 | 9 | < 3 | 10^2 |
| | (-) 8×10^2 | | | |
| | (+) 2×10^2 | | | |

Tabela 22. Resultados obtidos após análise do “swab” de mão de manipuladores da escola II

| Escola II | | | | | | |
|------------------|---|--|---|-----------------------|--|--|
| Amostra | <i>Staphylococcus spp</i> (UFC/ mão) | Coliformes totais (NMP/mão) | Coliformes termotolerantes (NMP/mão) | <i>E. coli</i> | Bolores e leveduras (UFC/mão) | |
| 30.08.10 B D | T. $6,5 \times 10^3$ | 43 | 9 | Presente | - | |
| | (-) $5,9 \times 10^3$ | | | | | |
| | (+) $6,5 \times 10^2$ | | | | | |
| 30.08.10 C D | T. 6×10^2 | 15 | < 3 | Ausente | - | |
| | (-) $4,8 \times 10^2$ | | | | | |
| | (+) $1,2 \times 10^2$ | | | | | |
| 23.09.10 C D | T. $1,3 \times 10^3$ | 23 | 4 | Ausente | - | |
| | (-) $1,3 \times 10^3$ | | | | | |
| | (+) - | | | | | |
| 18.10.10 D D | T. $3,6 \times 10^3$ | 4 | < 3 | Ausente | - | |
| | (-) $3,6 \times 10^3$ | | | | | |
| | (+) - | | | | | |
| 03.03.11 D D | T. 5×10^2 | < 3 | < 3 | Ausente | < 100 | |
| | (-) 5×10^2 | | | | | |
| | (+) - | | | | | |
| 03.03.11 D E | T. 2×10^3 | 43 | < 3 | Ausente | $2,5 \times 10^2$ | |
| | (-) 2×10^3 | | | | | |
| | (+) - | | | | | |
| | (-) $6,3 \times 10^3$ | | | | | |

Tabela 22. Continuação

| Amostra | <i>Staphylococcus spp</i> (UFC/ mão) | Coliformes totais (NMP/mão) | Coliformes termotolerantes (NMP/mão) | <i>E.coli</i> | Bolores e leveduras (NMP/mão) |
|--------------|---|--------------------------------|---|---------------|----------------------------------|
| 14.03.11 D D | T. 1,8x10 ⁴ | 4 | 3 | Ausente | 2,7x10 ³ |
| | (-) 1,8x10 ⁴ | | | | |
| | (+) - | | | | |
| 14.03.11 D E | T. 6,3x10 ³ | 43 | < 3 | Ausente | 2x10 ⁴ |
| | (-) 6,3x10 ³ | | | | |
| | (+) - | | | | |

Tabela 23. Resultados obtidos após análise de “ swab” de mão de manipuladores da escola III.

| Escola III | | | | | |
|--------------|---|--------------------------------|---|---------------|----------------------------------|
| Amostra | <i>Staphylococcus spp</i> (UFC/ mão) | Coliformes totais (NMP/mão) | Coliformes termotolerantes (NMP/mão) | <i>E.coli</i> | Bolores e leveduras (NMP/mão) |
| 18.08.10 E D | < 100 | 240 | < 3 | Ausente | - |

Tabela 23. Continuação

| Amostra | <i>Staphylococcus spp</i> (UFC/ mão) | Coliformes totais (NMP/mão) | Coliformes termotolerantes (NMP/mão) | <i>E. coli</i> | Bolores e leveduras (NMP/mão) |
|--------------|---|--------------------------------|---|----------------|----------------------------------|
| 18.08.10 F D | < 100 | < 3 | < 3 | Ausente | - |
| 08.09.10 E D | T. 10 ² | 43 | < 3 | Ausente | - |
| | (-) 10 ² | | | | |
| | (+) - | | | | |
| 08.09.10 F D | T. 2,4x10 ³ | 43 | < 3 | Ausente | - |
| | (-) 2,16x10 ³ | | | | |
| | (+) 2,4x10 ² | | | | |
| 01.10.10 E D | T. 10 ⁴ | 1100 | 4 | Presente | - |
| | (-) 10 ⁴ | | | | |
| | (+) - | | | | |
| 01.10.10 F D | T. 2x10 ² | < 3 | < 3 | Ausente | - |
| | (-) 2x10 ² | | | | |
| | (+) - | | | | |
| 18.10.10 E D | T. 2x10 ³ | < 3 | < 3 | Ausente | - |
| | (-) 2x10 ² | | | | |
| | (+) - | | | | |

Tabela 23. Continuação

| Amostra | <i>Staphylococcus spp</i> (UFC/ mão) | Coliformes totais (NMP/mão) | Coliformes termotolerantes (NMP/mão) | <i>E.coli</i> | Bolores e leveduras (NMP/mão) |
|--------------|---|--------------------------------|---|---------------|----------------------------------|
| 22.02.11 E D | < 100 | < 3 | < 3 | Ausente | $1,5 \times 10^2$ |
| 22.02.11 E E | T. 10^2 | < 3 | < 3 | Ausente | $1,5 \times 10^2$ |
| | (-) 5×10 | | | | |
| | (+) 5×10 | | | | |
| 22.02.11 F D | T. 10^2 | < 3 | < 3 | Ausente | 10^2 |
| | (-) 10^2 | | | | |
| | (+) - | | | | |
| 22.02.11 F E | T. 2×10^2 | < 3 | < 3 | Ausente | $1,5 \times 10^2$ |
| | (-) 10^2 | | | | |
| | (+) 10^2 | | | | |
| 14.03.11 E D | < 100 | < 3 | < 3 | Ausente | $9,5 \times 10^2$ |
| 14.03.11 E E | T. 10^2 | < 3 | < 3 | Ausente | 3×10^2 |
| | (-) 10^2 | | | | |
| | (+) - | | | | |
| 14.03.11 F D | T. 10^2 | < 3 | < 3 | Ausente | 2×10^3 |
| | (-) 10^2 | | | | |
| | (+) - | | | | |
| 14.03.11 F E | T. 4×10^2 | < 3 | < 3 | Ausente | 10^2 |
| | (-) 4×10^2 | | | | |
| | (+) - | | | | |

5.11 Check List

O check list está dividido em 6 categorias, as quais serão apresentadas separadamente. Os gráficos serão divididos em Conforme (C), quando a escola está de acordo com o item e Não Conforme (NC), quando a escola está em desacordo.

5.11.1 Aspectos Gerais de Recursos Humanos

Neste item foram avaliados 17 quesitos em relação aos manipuladores, sendo observado se os manipuladores recebiam treinamento; se este era reforçado periodicamente; se apresentavam boa higiene corporal; bom procedimento de higienização; se evitavam comportamentos incorretos, como fumar e tossir sobre os alimentos; se eram realizados exames médicos; se eram utilizados uniformes e sua condição de limpeza; condições das luvas térmicas e de borracha e trânsito de visitantes e manipuladores.

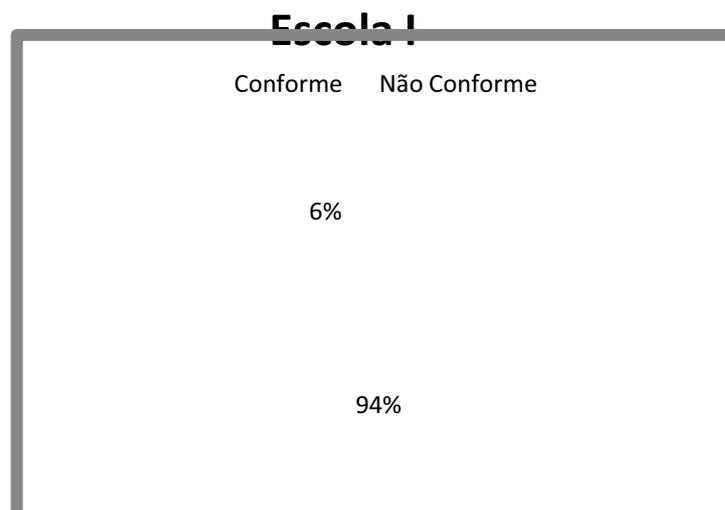


Gráfico 1. Resultados aspectos gerais de recursos humanos escola I

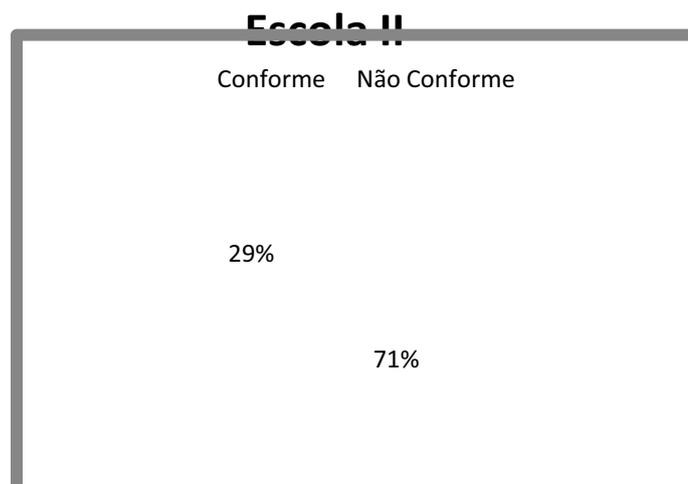


Gráfico 2. Resultados aspectos gerais de recursos humanos escola II

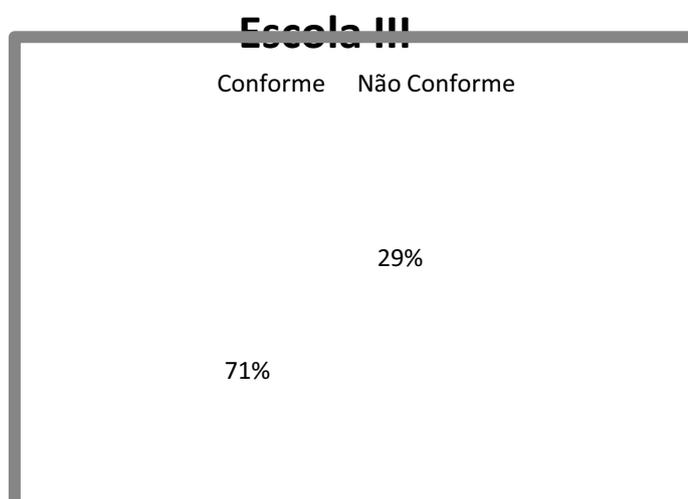


Gráfico 3. Resultados aspectos gerais de recursos humanos escola III

Podemos observar de acordo com os gráficos que a escola I é a que apresenta maior taxa de conformidade (94%) e a escola III a pior (29%).

Neste item foi observado manipuladores com esmalte em uma das escolas, manipuladores utilizando aliança e adornos em 2 escolas. Todas essas irregularidades são fáceis e de serem resolvidas e apresentam pouco custo financeiro e podem trazer muitas melhorias para manipulação dos alimentos

Em pesquisa sobre o conhecimento dos manipuladores de alimentos sobre boas práticas, Mello et al. (2010), constataram que o nível de conhecimento dos manipuladores foi considerado regular. Neves et al. (2011) ao pesquisarem o conhecimento dos manipuladores de carne em Portugal constataram que aproximadamente 50% acreditava que podia identificar alimentos contaminados apenas

pelo cheiro, olfato ou gosto e que 33% acreditava que só haveria contaminação dos alimentos se o manipulador estivesse doente. Estes dados podem contribuir para contaminação das refeições produzidas e o aparecimento de doenças transmitidas por alimentos.

5.11.2 Aspectos gerais de condições ambientais

Neste item foram observados os arredores da escola, se estes se encontravam livres de sucata, fossas, lixo, e se o acesso a escola era direto e independente. Este item apresenta apenas 2 quesitos. Os resultados podem ser observados nos gráficos de 4 a 6.

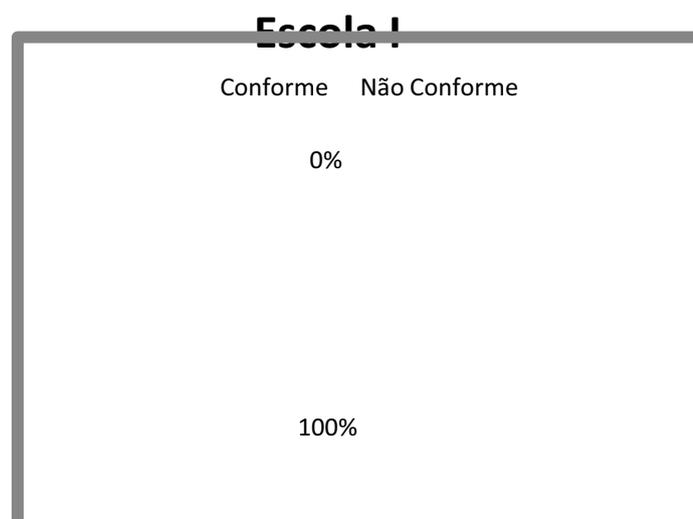


Gráfico 4. Aspectos gerais de condições ambientais na escola I

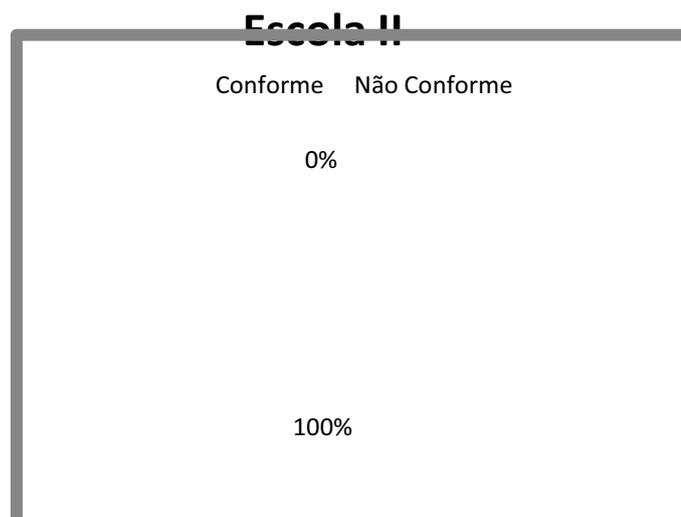


Gráfico 5. Aspectos gerais de condições ambientais na escola II



Gráfico 6. Aspectos gerais de condições ambientais na escola III

Pelos gráficos podemos observar que as escolas I e II estão 100% de acordo com os aspectos avaliados. A escola III está com apenas 50%, pois apresenta nos arredores da cozinha lugares que continham terra, os quais as crianças utilizam para brincar.

5.11.3 Aspectos gerais de instalações, edificações e saneamento

Este item é composto de 41 quesitos, sendo observados se o lay out da escola era adequado, evitando risco de contaminação cruzada; o estado das paredes e divisórias;

conservação e material dos pisos, ralos e canaletas; bom estado de conservação dos tetos e forros; a facilidade de limpeza das portas e se estas estavam em bom estado de conservação, disposição, limpeza; estado de conservação das janelas; iluminação; instalações elétricas; ventilação; existência de pias em quantidade suficiente para higienização, limpeza; facilidades dos sanitários; vestiários; lixo; caixas de gordura e reservatório de água. Os resultados podem ser observados nos gráficos de 7 a 9.

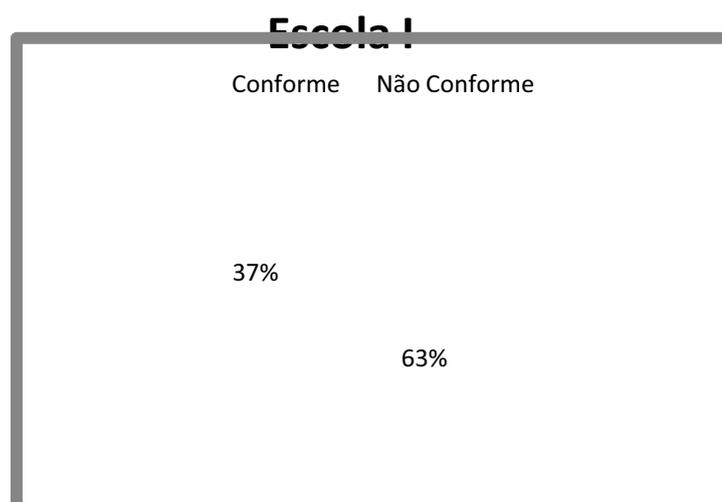


Gráfico 7. Aspectos gerais de instalações, edificações e saneamento da escola I



Gráfico 8. Aspectos gerais de instalações, edificações e saneamento da escola II



Gráfico 9. Aspectos gerais de instalações, edificações e saneamento da escola III

Em relação aos aspectos gerais de edificação, podemos observar que as escolas não variaram muito quanto à adequação mantendo mais ou menos o mesmo padrão (entre 61% e 73%). A escola II foi a que apresentou melhores resultados e a escola III os piores.

Com relação ao saneamento e limpeza, Silva, Germano e Germano (2000) ao avaliarem escolas em São Paulo constataram que 90% não apresentavam higiene das instalações de maneira correta. No estudo realizado nas escolas de São José do Rio Preto, este foi o quesito que mais se adequou, estando todas as escolas em ótimas condições de limpeza.

5.11.4 Aspectos gerais dos equipamentos

Este item conta com 3 quesitos, onde foram observados os equipamentos; utensílios e bancadas; se estes apresentavam a superfície lisa, impermeáveis, resistentes e não absorventes e se estavam em bom estado de conservação.

Os resultados encontrados podem ser observados nos gráficos 10 a 12.

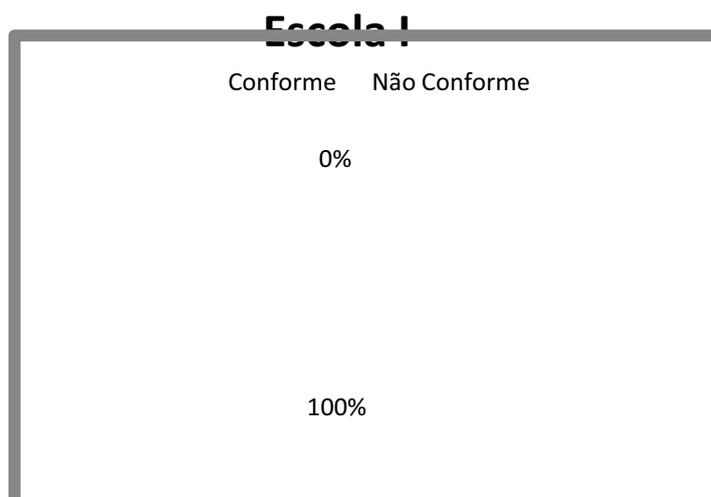


Gráfico 10. Aspectos gerais dos equipamentos da escola I

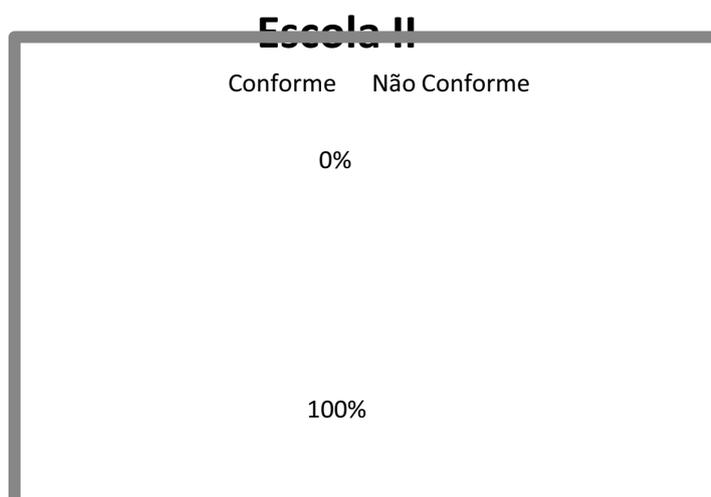


Gráfico 11. Aspectos gerais dos equipamentos escola II



Gráfico 12. Aspectos gerais dos equipamentos escola III

De acordo com os gráficos podemos observar que as escolas apresentaram um bom desempenho neste item, mantendo em bom estado os utensílios utilizados na cozinha e as bancadas onde são preparados os alimentos. A escola III apresentou inconformidades, pois ainda utiliza tábua e utensílios de madeira, dificultando a higienização.

5.11.5 Aspectos gerais de sanitização

Este item é composto de 19 quesitos. Foram avaliados os procedimentos de higienização; treinamento dos funcionários; frequência; produtos utilizados; local de armazenamento; programa de controle de pragas e registro do controle de pragas e dos procedimentos de higienização. Os resultados encontrados podem ser observados nos gráficos 13 a 15.

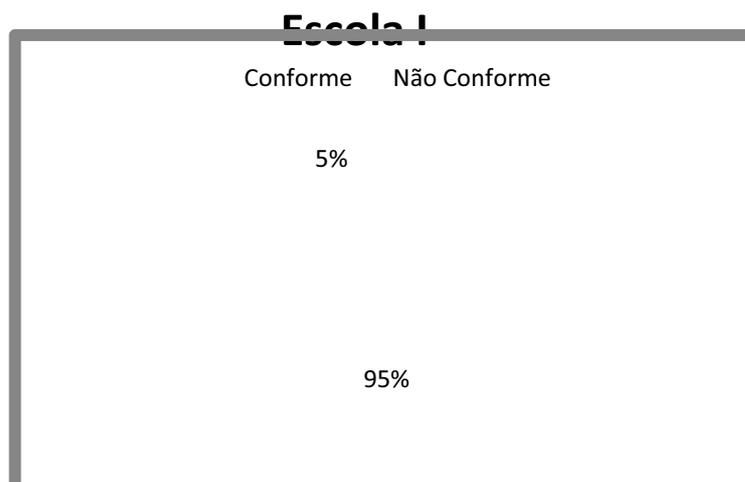


Gráfico 13. Aspectos gerais de sanitização da escola I

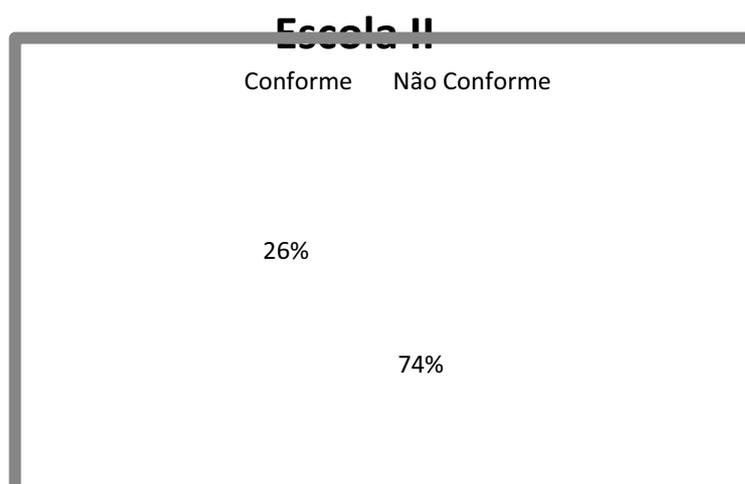


Gráfico 14. Aspectos gerais de sanitização da escola II

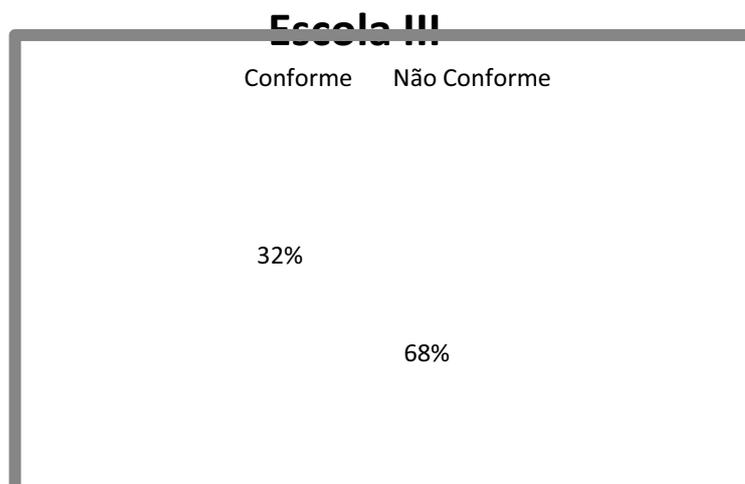


Gráfico 15. Aspectos gerais de sanitização da escola III

Com relação ao item de sanitização podemos observar que a escola I apresentou a maior taxa de adequação, com 95% e a escola III a pior, com 68%. Um item que foi comum nas 3 escolas é falta de registro (por escrito) e de modo visível dos procedimentos de higienização.

Em relação a este item em pesquisa das condições higiênico-sanitárias de uma cantina escolar Torres et al. (2007) encontrou na faixa de 60% de adequação.

5.11.6 Aspectos gerais de produção

Este item é composto de 47 quesitos, onde foram observados as matérias primas; seu recebimento e armazenamento; o estoque quanto a sua capacidade física; disposição e empilhamento dos produtos; armazenamento de acordo com os gêneros e prazo de validade dos produtos; preparo dos alimentos sendo observadas as etapas de congelamento e descongelamento; tempo e condições de armazenamento dos produtos prontos e higienização dos alimentos consumidos crus.

Os resultados encontrados podem ser observados nos gráficos 16 a 18.

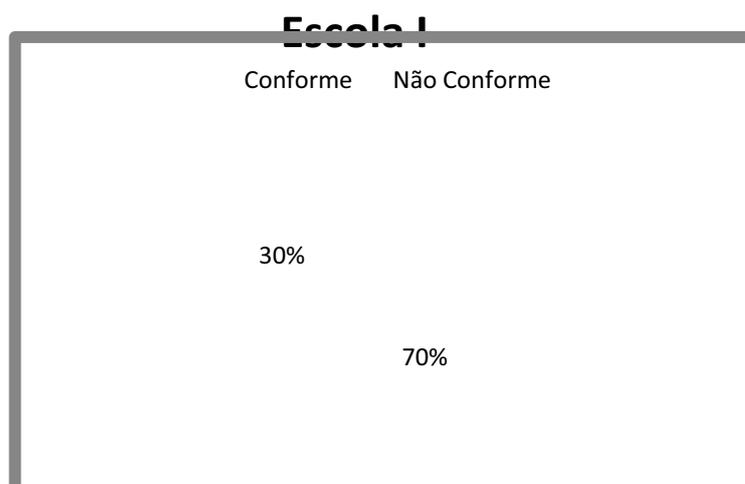


Gráfico 16. Aspectos gerais de produção da escola I



Gráfico 17. Aspectos gerais de produção da escola II

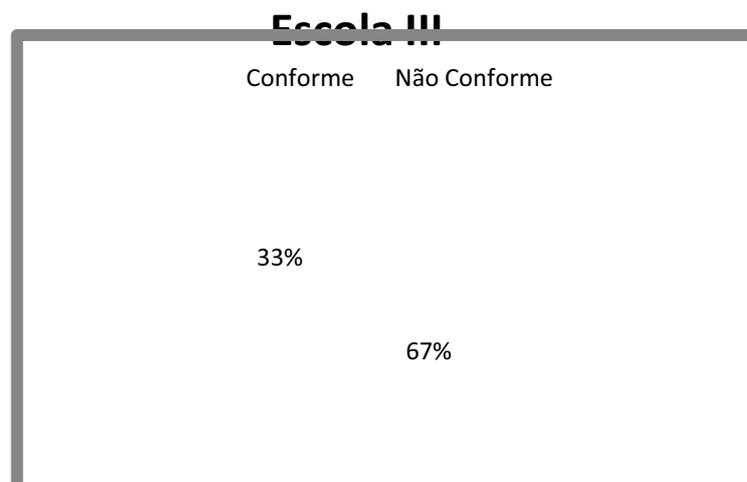


Gráfico 18. Aspectos gerais de produção da escola III

Os alimentos nas escolas são preparados de modo a minimizar as sobras e estas, quando presentes, não são reaproveitadas. Em estudo realizado por Silva, Germano e Germano (2003) as sobras de 95% das escolas também não foram utilizadas na merenda do dia seguinte.

Em todas as escolas observadas neste estudo os alimentos foram servidos logo que preparados, minimizando os riscos, porém esta não é a realidade para escolas pesquisadas em outros estudos. Estudo realizado por Oliveira, Germano e Germano (2001) revelou que em 90% das escolas observadas a merenda não era servida imediatamente após o preparo, passando muitas vezes por processo de reaquecimento.

Ao observarmos os gráficos podemos ver que a melhor escola, com 70% de adequação foi a I e a pior, com 61% de adequação foi II.

Um dos pontos críticos observados nas 3 escolas foi a falta do controle da temperatura, tanto dos equipamentos como dos alimentos, o que pode proporcionar o desenvolvimento de micro-organismos.

Torres et al. (2007) encontraram uma taxa de 20% de adequação, quando se tratava de armazenamento dos alimentos em baixas temperaturas, onde um dos maiores problemas foi a falta de espaço para armazenamento nas geladeiras e falta de controle da temperatura.

5.12 Susceptibilidade aos antimicrobianos

Foram testadas quanto a susceptibilidade aos antimicrobianos 16 cepas de *Staphylococcus aureus* e 7 cepas de *Escherichia coli*. Os resultados encontram-se nas Tabelas 24 e 25, sendo expressos em S (Sensível), I (Intermediário) e R (Resistente).

5.12.1 Cepas de *E.coli*

Os resultados deste trabalho para testes de susceptibilidade aos antimicrobianos para *E.coli* encontram-se na Tabela 24.

Tabela 24. Susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas de *E.coli*

| Antibióticos | Amostras/Escola | | | | | | |
|---------------|-----------------|----------|----------|------------|-----------|-----------|----------|
| | Salada II | Swab IIc | Água III | Salada III | Swab IIIa | Arroz III | Salada I |
| Amoxicilina | S | S | S | S | S | S | S |
| Ampicilina | S | S | S | S | S | S | S |
| Piperacilina | S | S | S | S | S | S | S |
| Cefalotina | R | I | S | I | S | I | I |
| Cefepime | S | S | S | S | S | S | S |
| Cefotaxime | S | S | S | S | S | S | S |
| Ceftiofur | S | S | S | S | S | S | S |
| Cefoxitim | S | S | S | S | S | S | S |
| Ceftazidime | S | S | S | S | S | S | S |
| Aztreonam | S | S | S | S | S | S | S |
| Ertapenem | S | S | S | S | S | S | S |
| Imipenem | S | S | S | S | S | S | S |
| Gentamicina | S | S | S | S | S | S | S |
| Tobramicina | S | S | S | S | S | S | S |
| Amicacina | S | S | S | S | S | S | S |
| Levofloxacina | S | S | S | S | S | S | S |
| Ofloxacina | S | S | S | S | S | S | S |

Neste estudo, das 7 cepas de *E. coli* testadas, 2 foram sensíveis a todos antimicrobianos, 1 foi resistente a 1 antimicrobiano (cefalotina) e 4 tiveram resistência intermediária a este mesmo antimicrobiano.

Em estudo da incidência de *E. coli* resistente aos antimicrobianos em queijos, Unlu et al. (2011) analisou 150 cepas onde encontrou todas resistentes a Lincimicina e Vancomicina e todas sensíveis a Mezlocilina Sulfametoxazol + Trimetropim e Meropenem. Foi observado também uma alta taxa de resistência intermediária a Amicacina, Gentamicina e Oxitetraciclina.

Zanatta et al. (2004) ao pesquisarem a sensibilidade de *E. coli* de origem aviária, encontraram 93 das 120 cepas analisadas resistentes a 3 ou mais antimicrobianos, e nenhuma das drogas testadas neste trabalho foi eficiente para todas as cepas.

Schroeder et al. (2002) detectaram duas amostras de *E. coli* isoladas de humanos resistentes a ceftiofur, droga de uso exclusivo em veterinária. O fato de bactérias de origem animal se tornarem multirresistentes chama a atenção para possibilidade de transferência de genes de resistência e posterior dificuldades de tratamento em humanos, quando necessário. Estes resultados são importantes, pois a resistência a antimicrobianos é uma ameaça a saúde pública mundial.

5.12.2 Cepas de *S. aureus*

Os resultados deste trabalho para pesquisa de susceptibilidade aos antimicrobianos para este microrganismo encontram-se na Tabela 25.

Tabela 25. Susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas de *S. aureus*

| Antibióticos | Amostras/escolas | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|--------------------|--------------------|----------------|-----------------|-----------------------|-------------------|--------------------|-------------|----------------|--------------------|---------------------|-----------------|-----------------|---------------|------------------|------------------|
| | Swab 20 I AD | Swab III D R | Arroz III/7 | Arroz III/25 | Swab III D R/25 | Swab III EM | Swab I E E a | Swab I D | Swab II D D | Swab I A D b | Swab 22 I E E | Arroz III/22 | Arroz III/23 | Purê II/44 | Feijão III/26 | Feijão III/24 |
| Penicilina | S | S | S | R | S | S | S | S | S | R | R | S | R | R | S | S |
| Oxacilina | S | S | I | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| Gentamicina | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| Azitromicina | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S |
| Clindamicina | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| Sulfametoxazol | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S |
| Cloranfenicol | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| Linezolida | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| Tetraciclina | S | R | S | S | S | R | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S |
| Ciprofloxacino | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| Eritromicina | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S |

Pelos dados obtidos na Tabela podemos observar que, neste estudo, 6 cepas das 16 analisadas foram sensíveis a todos antibióticos testados, 9 foram resistentes a 1 antibiótico, 1 cepa foi resistente a 3 e 1 resistente a 5 antibióticos.

Das drogas testadas, a Penicilina foi a que apresentou maior perfil de resistência, com 5 cepas resistentes a ela, seguida pela Tetraciclina com 3 cepas resistentes e Azitromocina, Sulfametoxazol e Eritromicina, com 2 cepas cada. A Gentamicina, Cloranfenicol e Ciprofloxacino foram eficientes para 100% das cepas testadas.

Pereira T al. (2009) ao testarem 148 amostras de *Staphylococcus* coagulase positiva encontrou 38% resistentes a Oxacilina, 70% resistente aos beta lactâmicos e 73% resistentes a Penicilina e Ampicilina.

Zafalon T al. (2008) também encontraram relativa resistência das cepas de *S. aureus* a Penicilina (48,3%) em amostras de leite. Encontraram também resistência a Oxacilina e algumas cepas com características de multirresistência a outros antimicrobianos.

Neste estudo as cepas analisadas apresentaram-se sensíveis a maioria dos antibióticos testados. Apesar disso, o desenvolvimento de resistência relatado em outros estudos constitui um risco em saúde pública, podendo comprometer o tratamento com antimicrobianos utilizados rotineiramente, enfatizando a necessidade do uso racional dessas drogas.

6.0 CONCLUSÕES

- A merenda escolar servida nas escolas estudadas oferece riscos a saúde das crianças
- A escola I foi a que apresentou os melhores resultados com relação à análise microbiológica da merenda escolar.
- A escola II foi a que apresentou os piores resultados com relação à análise microbiológica da merenda escolar
- Há a necessidade da melhoria na qualidade da água utilizada no preparo da merenda
- A escola I foi a que apresentou os melhores resultados para análise de água.
- A escola III foi a que apresentou os piores resultados em relação à análise de água.
- Manipuladores de alimentos necessitam de treinamento e melhores instruções quanto a higienização das mãos
- A escola II foi a que apresentou os piores resultados para análise do “swab”, onde 6 das 8 amostras analisadas apresentaram contagens elevadas dos micro-organismos testados.
- A escola III foi a que apresentou os melhores resultados para análise do Swab de mão onde apenas 4 das 15 amostras apresentaram irregularidades.
- Há a necessidade de adequações estruturais por parte das escolas estudadas
- A escola III foi a que apresentou as piores taxas de adequação em todos os quesitos.
- Merenda escolar apresenta cepas com resistência a antimicrobianos

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUSHELAIBI, A. A.; SOFOS, J. N.; SAMELIS, J.; KENDALL, P. A. Survival and growth of *Salmonella* in reconstituted infant cereal hydrated with water, milk or apple juice and stored at 4° C, 15° C and 25° C. **Food Microbiology**, v. 20, p. 17-25, 2003.

ACCO, M.; FERREIRA, F. S.; HENRIQUES, J. A. P.; TONDO, E. C. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. **Food Microbiology**, v. 20, p. 489-493, 2003.

ALMEIDA, R. C. C.; KUAYE, A. C. Y.; SERRANO, A. M.; ALMEIDA, P. F. Avaliação e controle da qualidade microbiológica de mão de manipuladores de alimentos. **Revista de Saúde Pública, São Paulo**, v.29, n.4 p. 290-294, 2005.

ALMEIDA, V. F. S. et al. Avaliação dos indicadores higiênico-sanitários e das características físico-químicas em águas utilizadas em escolas públicas de nível fundamental. **Rev Inst Adolfo Lutz**, 68(3) p 334-340, 2009.

ANGELILLO, I. F.; VIGGIANI, N. M. A.; RIZZO, L.; BIANCO, A. Food handlers and foodborne disease: knowledge attitudes and reported behavior in Italy. **Journal of Food Protection**, v.3, p. 381-385, 2000.

ASLAM, M. S.C. Antimicrobial resistance and genetic profiling of *Escherichia coli* from a commercial beef packing plant. **Journal of Food Protection**, v.69, p. 1508-1513, 2006.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. S. C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin Pathol**. 1966; 45(4):493-6.

BENNETT, R. W. & BELAY, N. (2001). *Bacillus cereus*. In Dowes, F. P., K. Ito(ed), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D. C. chapter 32, 311-316.

BENNETT, R. W., & LANCETTE, G. A. (2001). *Staphylococcus aureus*. In **Bacteriological analytical manual online**: US Food & Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071429.htm>

BERJÓN, F.D.; MORENO, J.C.S.; SOBRADO,R.R.; GARRIDO,M.A.; CIVANTOS, A. M.; OBRA, R. N. Brote de toxiinfecção alimentaria por *Clostridium perfringens* em um comedor escolar. **Med Clin**, Barcelona, 121 (2), p. 58-60, 2003.

BRASIL. Resolução RDC n 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília , DF, 10 jan. de 2001

_____. Resolução ANVISA RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos e a lista de verificação das boas práticas de fabricação em estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 6 nov. 2002, Seção 1, p. 4-21.

_____. Resolução ANVISA. RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 16 set. 2004a. – acrescente em sua citação no texto o ano 2004 seguido da letra a.

_____. Portaria ANVISA nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de portabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 26 mar. 2004b. – acrescente em sua citação no texto o ano 2004 seguido da letra b.

BAPTISTA, A. S.; HORII, J.; BAPTISTA, A. S. Fatores físico-químicos e biológicos ligados a produção de micotoxinas. **Boletim Ceppa**, Curitiba, v. 22, n. 1, p. 1-14, 2004.

BRYAN, F. L. Diseases transmitted by foods. **In-The United States Centers for Disease Control**, classification and summary, 2 ed, Atlanta, 1982.

BRITO, C. S.; ROSSI, D. A. Bolores e leveduras, coliformes totais e fecais em sucos de laranja *in natura* e industrializados não pasteurizados comercializados na cidade de Uberlândia - MG. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, n. 1, p. 133 - 140, jan. / abr., 2005.

CALDAS. E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos, risco para saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, V. 36, p. 319-323, 2002.

CALIL, R.; AGUIAR, J. **Nutrição e administração nos serviços de alimentação escolar**. São Paulo: Marco Markovitch, 1999.

CARDOSO, R. C. V. et al. Qualidade da água utilizada em escolas atendidas pelo Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE), em Salvador-BA. **Rev Inst Adolfo Lutz**, 66(3) p.287-291, 2007.

CARLIN, F. Origin of bacterial spores contaminating foods. **Food Microbiology**, v.28, p. 177-182, 2008.

COSTA, L.L.F.; SCUSSEL, V. M. Toxigenic fungi in beans (*Phaseolus vulgaris l.*) classes black and color cultivated in the state of Santa Catarina, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. V33, p 138-144, 2002.

COSTA, R. A.; MOURÃO, J. A.; ÂNGELO, A. M. O.; VIEIRA, G. H. F.; ALVES, L. A.O. Análise bacteriológica de merenda escolar servida em um colégio estadual de Sobral, Ceará. **Higiene Alimentar**. v.22, n166/167, p138-141, 2008.

DUARTE, D. A. M., et al. Ocurrence of *Salmonella spp.* In broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, 2009.

FAUSTINO, J. S. et al. Análises microbiológicas de alimentos processados na Baixada Santista, envolvidos em doenças transmitidas por alimentos, no período de 2000 – 2006. **Rev. Instituto Adolfo Lutz**, 66(1), p. 23-30, 2007.

FAWELL, J.; NIEUWENHUIJSEN, M. J. Contaminants in drinking water. **British Medical Bulletin**, vol 68 p. 199-208, 2003

FDA/CEFSAN (2005). **Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook “Bad Bug Book”**. Food and Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. 1 ed Artmed: Porto Alegre, 424p, 2005.

FREITAS, M. F. L. et al. Detecção de genes toxigênicos em amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijo coalho. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 29(2), p. 375-379, 2009.

GAVA, A. J. **Princípios de Tecnologia de Alimentos**. Nobel: São Paulo, 2004

GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Mc Graw Hill, Ed. 10, 1647p, 2003.

HUONG, B. T. M. et al. Toxigenicity and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from Vietnamese ready-to-eat foods. **Food Control**, v.21, p. 166-171, 2010.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed Artmed: Porto alegre, 711p, 2005.

KAKU, M. et al. Surto alimentar por *Salmonella enteritidis* no noroeste do estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 127-137, 1995.

KEERATIPIBUL, S.; PHEWPAN, A.; LURSINSAP, C. Prediction of coliforms and *Escherichia coli* on tomato fruits and lettuce leaves after sanitizing by using Artificial Neural Networks. **Food Science and Technology**. 44(2011) 130-138.

KORNACKI, J. L. & JOHNSON, J. L. (2001) Enterobacteriaceae, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Downes, F. P., and K. Ito (ed), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4th ed .American Public Health Association, Washington, D. C., chapter 8, 69-82.

LABBE, R. G. (2001). *Clostridium perfringens*. In Downes, F. P. and K. Ito(ed), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination on Foods**, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D. C. chapter 34, 325-330.

LAGGAGGIO, V. R. A.; FLORES, M. L.; SEGABINAZI, S. D. Avaliação microbiológica da superfície das mãos dos funcionários do restaurante universitário da Universidade Federal de Santa Maria, RS. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n.100, p. 107-110, 2002.

LINDSTROM, M.; HEIKINHEIMO, A.; LAHTI, P., KORKEALA, H. Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. **Food Microbiology**, v. 28, p. 192-198, 2011.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**, 12ª. Ed Porto Alegre: Artmed, 1128p 2010.

MELLO, A. G.; GAMA, M. P.; MARIN, V. A.; COLARES, L. G. T. Conhecimento dos manipuladores de alimentos sobre boas práticas nos restaurantes públicos populares do Estado do Rio de Janeiro, **Brazilian Journal of Food Technology**, V. 13, n. 1, p. 60-68, 2010.

MENDES, R. A.; AZEREDO, R. C. M.; COELHO, A. M. I.; OLIVEIRA, S. S.; COELHO, M. L. R. Contaminação ambiental por *Bacillus cereus* em unidade de alimentação e nutrição. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.17, n 2, Abril, Junho, 2004.

MENEZES, F. et al. Princípios e diretrizes de uma política de segurança alimentar e nutricional. Conselho **Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional – CONSEA**. Brasília, 80p, 2004.

MESQUITA, M. O.; DANIEL, A. P.; SACCOL, A. F. L.; MILANI, L. G. I.; FRIES, L. M. L. Qualidade microbiológica no processamento do frango assado em unidade de alimentação e nutrição. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v 26, n 1, p.198-203, 2006.

MONTEIRO, M.C. N.; TIMBÓ, M. O. P. P.; OLIVEIRA, S. C. A.; COSTA, L. A. T. Controle higiênico-sanitário de manipuladores de alimentos de cozinhas industriais no estado do Ceará. **Higiene Alimentar**, V. 15, n. 89, p. 90-93, 2001.

National Committee For Clinical Laboratory Standard. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing, 2011.

NETO CUNHA, A.; SILVA, C. M. G.; STAMFORD, T. M. L. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v22, n 3, p.263-271, 2002

NEVES, E. G.; CARDOSO, C. S.; ARAÚJO, A. C.; COSTA, J. M. C. Meat handlers training in Portugal: A survey on knowledge and practice. **Food Control**, v.22, p. 501-507, 2011.

NOGUEIRA, G.; NAKAMURA, C. V.; TOGNIM, M. C.B.; ABREU FILHO, B. A., DIAS FILHO, B. P. Microbiological quality of drinking water of urban and rural communities, Brazil. **Rev. Saúde pública** 37(2), p.232-236, 2003.

OLIVEIRA, A.C.B.; GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Avaliação dos alimentos cárneos servidos no programa de alimentação escolar de um município da Grande São Paulo: ênfase nos aspectos de tempo e temperatura. **Higiene Alimentar**, v.18, n.124, p.24-29, 2001.

PASSOS, E. C. et al. Surto de toxinfecção alimentar em funcionários de uma empreiteira da construção civil no município de Cubatão, São Paulo/Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 67(3), p 237-240, 2008.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. S. C.; KRIEG, N. R. **Microbiologia conceitos e aplicações**. 2 ed. Makron books: São Paulo, 1996.

PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J. GIBSS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production , virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from varius foods in Portugal. **Food Microbiology**, v. 26, p.278-282, 2009.

PERESI et al. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella enteritidis*. **Revista de Saúde Pública**, 32(5), p 477-483, 1998.

PONCE, E., et al. Prevalence and characterization of *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from imported seafood. **Food Microbiology**, v.25, p. 29-35, 2008.

RAAL, V. L. M. et al. Detection of enterotoxin genes of *Staphylococcus* sp isolated from nasal cavities and hands of food handlers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p. 54-65, 2010.

REYES, J. E.; BASTÍAS, J.M.; GUTIÉRREZ, M.R.; RODRÍGUEZ,M.O. Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean Scholl Feeding Program. **Food Microbiology**, 24, p 1-6, 2007.

RICHARDS, M. S. et al. Investigation of a *Staphylococcal* food poisoning outbreak in a centralized school lunch program. **Public Health Rep.** n 108, p 765-771, 1993.

SCHROEDER, C.M. et al. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O26, O103, 00128, and O145 from animals and humans. **Emerg Infect Dis.**, v.8, n.12, 2002.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Sanitária. Portaria CVS nº. 18, de 9 de setembro de 2008. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre os

parâmetros e critérios para o controle higiênico-sanitário em estabelecimentos de alimentos. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, São Paulo, SP, 11 de set. de 2008, Seção 1, p. 25.

SAMSON, K. M. J., BUSTA, F. F., PETERSON, E. H., JOHNSON, M. G.(1992). Colony Count Methods. In Vanderzant, C., Splittstoesser, D. F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods**. 3rd Ed., Washington: American Public Health Association. 75-96.

SILVA, C.; GERMANO, M. I. S.; GERMANO P. M. L. Avaliação das condições higiênico-sanitárias da merenda escolar. **Higiene Alimentar**, v 14, p 24-30, 2000.

_____; _____. Condições higiênico sanitárias dos locais de preparação da merenda escolar, da rede estadual de ensino em São Paulo, SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 110, p. 49-55, 2003.

SILVA, N. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* 0157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 167-173, 2003.

_____. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica da água**. São Paulo: Varela, 2005. 164 p.

_____. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2010.

SOARES, C. M.; VALADARES, G. F.; AZEREDO, R.M.C.; KUAYE, A.Y. Contaminação ambiental e perfil toxigênico de *Bacillus cereus* isolado em serviços de alimentação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.2, p.504-510, 2008.

SOON, M. J.; SINGH, H.; BAINES, R. Foodborne disease in Malaysia: A review. **Food Control**. V. 22, P. 823-830, 2011.

SOTO, et al. Monitoramento da qualidade da água de poços rasos de escolas públicas da zona rural do município de Ibiúna/SP: parâmetros microbiológicos, físico-químicos e fatores de risco ambiental. **Rev. Instituto Adolfo Lutz**, 65(2) p. 106-111, 2006.

SOUSA, C.P. The impact of food manufacturing practices on food borne diseases. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. V.51, n4 p 815-823, 2008.

SZEWZYK, U. et al. Microbiologicak Safety of Drinking Water. **Annu. Rev. Microbiol.** V. 54 p.81–127, 2000.

TAVECHIO, A. T. et al. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella Enteritidis* in São Paulo, Brazil. **Rev Ins Med Tropical São Paulo**, v. 38, p. 315-322, 1996.

TORRES, S. A. M., SILVA, V. A., COELHO, A. I. M., MIRANDA A. S. Análise das condições higiênico-sanitárias durante o preparo da alimentação em cantina escolar. **Higiene Alimentar**, v.21, n. 153, p.14-18, 2007.

TORTORA, G. J., FUNKE B. R., CASE C. L. **Microbiologia**. 8 ed Artmed, São Paulo, 894p,2008.

TULANE, D. Intervenções para reduzir a insegurança alimentar: Uma síntese dos atuais conceitos e abordagens para a América Latina. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.21 (suplemento) p. 159-173, 2008

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ,O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3. ed. Atheneu: São Paulo.

UNLU, T. et al. Incidence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from different kinds of cheese. **Journal of Food Safety**, v. 31, p. 54-60, 2011.

VIEIRA, C.R.N.; SILVA,R.R.; MARTINO,H.S.D.; CHAVASCO,J.K. Qualidade microbiológica da merenda escolar servida nas escolas estaduais de Poços de Caldas, MG. **Higiene Alimentar**. V.19, n 128, p 90-94, 2005.

ZAFALON, L. F. et al. Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 67, p.118-125, 2008.

ZANATTA, G. F., et al. Susceptibilidade de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária a antimicrobianos. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.71, n.3, p. 283-286, 2004.

World Health Organization. WHO. **Guidelines for drinking water quality** [acesso 2010 Nov 17]. Disponível em http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/en/index.html