

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Nutrição**  
**Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos**



**Dissertação**

**Avaliação das Boas Práticas e Identificação de Fontes de Contaminação  
de Alimentos Servidos em Restaurantes Hoteleiros**

**Aline de Oliveira Rodrigues**

**Pelotas, 2015**

**Aline de Oliveira Rodrigues**

**Avaliação das Boas Práticas e Identificação de Fontes de Contaminação  
de Alimentos Servidos em Restaurantes Hoteleiros**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Dias Timm  
Coorientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia dos Santos da Conceição  
Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

R696a Rodrigues, Aline de Oliveira

Avaliação das boas práticas e identificação de fontes de contaminação de alimentos servidos em restaurantes hoteleiros / Aline de Oliveira Rodrigues ; Cláudio Dias Timm, orientador ; Rita de Cássia dos Santos da Conceição, Eliézer Ávila Gandra, coorientadores. — Pelotas, 2015.

51 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Segurança dos alimentos. 2. Staphylococcus coagulase positiva. 3. Coliformes termotolerantes. 4. Rep-PCR. I. Timm, Cláudio Dias, orient. II. Conceição, Rita de Cássia dos Santos da, coorient. III. Gandra, Eliézer Ávila, coorient. IV. Título.

CDD : 641.1

Elaborada por Aline Herbstrith Batista CRB: 10/1737

Aline de Oliveira Rodrigues

Avaliação das Boas Práticas e Identificação das Fontes de Contaminação de  
Alimentos Servidos em Restaurantes Hoteleiros

Dissertação aprovada como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. Faculdade de Nutrição. Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 19/03/2015

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Dias Timm (orientador)  
Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra  
Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia da Silva Nascente  
Doutora em Ciências pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kelly Lameiro Rodrigues (suplente)  
Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

## **Agradecimentos**

À Universidade Federal de Pelotas em especial ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

Ao Prof. Dr. Cláudio Dias Timm pela orientação, apoio e ensinamentos que foram de fundamental importância para a minha formação profissional.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rita de Cássia dos Santos da Conceição e ao Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra por toda colaboração e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À todos os mestrandos, doutorandos, estagiários e funcionários do laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, esclarecendo dúvidas e oferecendo ajuda sempre que solicitados.

À gerência da unidade hoteleira Swan Express Rio Grande por permitir meu afastamento do trabalho para cumprir com meus compromissos acadêmicos e atividades laboratoriais para desenvolvimento deste trabalho.

À todos os estabelecimentos da região que aceitaram participar da pesquisa e tornaram possível a realização deste projeto.

Aos meus queridos amigos por compreenderem minha ausência em tantos momentos e por todas as palavras e gestos de apoio dedicados a mim nos momentos que mais precisei. Obrigada pela torcida!

Em especial, a minha mãe Maranéte de Oliveira Rodrigues, que ofereceu todo seu apoio e incentivo para que eu concluísse mais essa etapa, sem a sua ajuda tudo seria muito mais difícil. E ao meu irmão Michel que juntamente com a nossa mãe formam a base fundamental da minha formação, onde sempre encontro carinho e estímulo para prosseguir. À vocês meu muito obrigada!

## Resumo

RODRIGUES, Aline Oliveira de. **Avaliação das Boas Práticas e Identificação das Fontes de Contaminação de Alimentos Servidos em Restaurantes Hoteleiros**. 2015.51f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 2015.

O setor hoteleiro vem se expandindo mundialmente a cada ano e dentre os serviços oferecidos, a gastronomia é um dos mais requisitados, através da qual busca-se a satisfação do cliente, oferecendo produtos seguros e de qualidade. Paralelamente ao incremento do turismo, a incidência de doenças de origem alimentar está crescendo em todo mundo. Acredita-se que o consumo de alimentos contaminados seja a principal causa de doenças em turistas. Neste contexto o objetivo deste estudo foi avaliar a aplicação das boas práticas em restaurantes hoteleiros da cidade de Pelotas/RS e Rio Grande/RS e relacioná-las com a qualidade microbiológica dos alimentos oferecidos, além de identificar fontes de contaminação. O setor de alimentos e bebidas (A&B) de quatro hotéis foi avaliado quanto às condições higiênicossanitárias em duas visitas, com intervalo mínimo de 30 dias, através de aplicação de *check list* fundamentado na norma da RDC 216/2004, e de análises microbiológicas de amostras coletadas no local. Foram realizadas coletas de amostras de superfícies de utensílios, equipamentos e mãos de manipuladores para contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e de coliformes termotolerantes. Isolados obtidos das culturas dessas contagens foram comparados através de perfis de genéticos obtidos por rep-PCR. Considerando as não conformidades observadas no *check list*, na primeira visita apenas um hotel foi classificado como ótimo, dois foram classificados como bons e um recebeu a classificação ruim. Entretanto, na segunda visita o hotel classificado como ruim passou para bom, devido à realização de melhorias no restaurante. Alguns resultados das análises microbiológicas apresentaram limite acima do permitido para a contagem dos micro-organismos analisados, identificando falha na aplicação das boas práticas. Através da técnica de rep-PCR, foi identificada uma mesma cepa em amostras de queijo e mãos, manteiga e tábua de corte, queijo e tábua de corte e salada de frutas e mãos, evidenciando

contaminação cruzada devido falhas no processo de higiene e manipulação dos alimentos.

**Palavras chave:** segurança dos alimentos; *Staphylococcus* coagulase positiva; coliformes termotolerantes; rep-PCR.

## . Abstract

RODRIGUES, Aline Oliveira de. **Evaluation of Good Practice and Identification of Contamination Sources in Served Food of Hotel Restaurants**. 2015.51p. Dissertation (MSc) Programme Postgraduate Nutrition and food. Federal University of Pelotas, Pelotas.

The hotel industry has been expanding every year and among the services offered, the cuisine is one of the most requested, which seeks customer satisfaction by offering safe and quality products. Parallel to the tourism development, the incidence of foodborne diseases is growing worldwide. It is believed that the consumption of contaminated food is the major cause of disease in tourists. This study goal was to evaluate the application of best practices in hotel restaurants in the cities of Pelotas/RS and Rio Grande/RS and relate it to the microbiological quality of the food offered, besides to identify sources of contamination. The sector of food and beverages (F&B) of four hotels was evaluated in two visits with an interval of 30 days regarding hygiene-sanitary conditions, by application of check list and microbiological analyzes of samples collected on site. Surface, utensils, equipment and hands handlers samples have been collected for counting coagulase positive *Staphylococcus* and thermotolerant coliform. Isolates obtained from these counting cultures were compared by bands profiles obtained by rep-PCR. According to the non-conformity observed in the check list on the first visit, only one hotel was rated as great, two were classified as good and one received a bad rating. However, on the second visit, the one considered bad got a good rate due to improvements in its unit. Some microbiological analysis showed a limit above the allowed for the count of analyzed microorganisms, identifying failure in the hygiene-sanitary process. By rep-PCR, was identified the same strain in samples of cheese and hands, butter and cutting board, cutting board and cheese and fruit salad and hands, showing cross-contamination due to flaws in the process of care and handling of food.

**Key words:** food security; coagulase positive *Staphylococcus*; thermotolerant coliform; rep-PCR.



## Lista de Tabelas

Tabela 1 Percentual de inadequação, na primeira visita, do setor de A&B em hotéis de Rio Grande e Pelotas/RS, por blocos avaliados, 2014.....	58
Tabela 2 Percentual de inadequação, na segunda visita, do setor de A&B em hotéis de Rio Grande e Pelotas/RS, por blocos avaliados, 2014.....	60
Tabela 3 Resultados das análises microbiológicas de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva e coliformes termotolerantes dos alimentos analisados nos hotéis de Rio Grande e Pelotas/RS, 2014.....	62
Tabela 4 Resultados das análises microbiológicas de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva e coliformes termotolerantes das mãos de manipuladores, equipamentos e utensílios analisados nos hotéis de Rio Grande e Pelotas/RS, 2014.....	64

## Lista de Abreviatura e Siglas

A&B	Alimentos e Bebidas
Aa	Atividade de Água
ABP	Ágar Baird Parker
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHA	American Public Health Association
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
APT	Água Peptonada Tamponada
BHI	Brain Heart Infusion
BP	Boas Práticas
BPF	Boas Práticas de Fabricação
Caldo EC	Caldo Escherichia Coli
CDC	Center for Disease Control and Prevention
DTA	Doença Transmitida por Alimentos
EE	Enterotoxina Estafilocócica
EMBRATUR	Instituto Brasileiro de Turismo
FAO	Food and Agriculture Organization
MBP	Manual de Boas Práticas
MS	Ministério da Saúde
NMP	Número Mais Provável
PCR	Polymerase Chain Reaction
POP	Procedimento Operacional Padronizado
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
repPCR	Repetitive Polymerase Chain Reaction
RS	Rio Grande do Sul
SCP	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva
TNase	Termonuclease
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
WHO	World Health Organization

## Sumário

Introdução Geral.....	12
Revisão de Literatura .....	15
Projeto de Pesquisa.....	27
Relatório de Trabalho de Campo.....	49
Artigo.....	50
Referências.....	67

## **Introdução Geral**

O turismo vem se expandindo mundialmente, obtendo crescimento de 5% ao ano, em média, desde 2010, segundo a Organização Mundial do Turismo (OMT, 2014), proporcionando desenvolvimento e oportunidades econômicas em todo o mundo.

Frente à expansão do turismo, ocorre também o desenvolvimento do mercado hoteleiro que oferece diversos serviços, entre eles o de alimentos e bebidas (A&B), sendo este de fundamental importância devido à necessidade de produzir alimentação balanceada e segura a fim de proporcionar a satisfação e garantir que o cliente não seja exposto a nenhum perigo de origem alimentar (SOUZA et al., 2009). Diante da crescente valorização do setor, da competitividade e preocupação com o consumidor, é essencial que os estabelecimentos busquem se destacar por meio da qualidade dos produtos e serviços ofertados. A gastronomia é um dos serviços mais requisitados no setor hoteleiro e para atender as expectativas dos clientes é necessário que os estabelecimentos, manipuladores e/ou processadores de alimentos formulem e apliquem estratégias higiênicossanitárias que contemplem desde a seleção de fornecedores de matéria-prima até a entrega do produto final ao consumidor, de forma a garantir a segurança e a manutenção da qualidade dos alimentos (FONSECA et al., 2010).

Para o aperfeiçoamento constante das ações de controle sanitário com o objetivo de monitorar e minimizar os riscos de ocorrência de ingestão de alimentos contaminados, é necessária a implementação das Boas Práticas (BP), que são constituídas por normas de procedimentos a fim de atingir um determinado padrão de identidade e qualidade de um produto e/ou serviço na área de alimentos, incluindo-se bebidas, utensílios e materiais que entram em contato com o produto (AKUTSU et al., 2005).

As BP são normas obrigatórias pela legislação brasileira para todas as indústrias e estabelecimentos produtores de alimentos e estão pautadas nas Portarias nº 1428/93 (BRASIL, 1993), nº 368/97 (BRASIL, 1997) e nº 78/2009 (RS, 2009), e nas Resoluções da Direção Colegiada da ANVISA RDC nº 275/2002 (BRASIL, 2002) e nº 216/2004 (BRASIL, 2004).

Uma importante ferramenta utilizada para a avaliação das BP é a lista de verificação ou *check list*, que pode ser desenvolvida conforme as normas da RDC nº216/2004 determinada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que permite fazer uma avaliação preliminar das condições higiênicossanitárias de um estabelecimento produtor de alimentos avaliando a presença de não conformidades (NC) (SEIXAS et al., 2008).

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são micro-organismos de ampla distribuição, mas são encontrados principalmente na pele e mucosas dos seres humanos e de outros mamíferos (NEVES et al., 2007). *Staphylococcus aureus* é a espécie mais relacionada a casos e a surtos de intoxicação alimentar, devido à capacidade de produzir enterotoxinas (SILVA et al., 2001). Além de *S. aureus*, também *S. hyicus* e *S. intermedius* têm sido associados a surtos de intoxicação de origem alimentar, sendo estas três espécies as de maior interesse em microbiologia de alimentos dentro deste gênero (FRANCO e LANDGRAF, 2003). Estes micro-organismos são capazes de produzir coagulase, uma enzima extracelular que coagula o plasma sanguíneo, característica que é muito utilizada na rotina laboratorial como indicativa destas espécies (BRASIL, 2003).

A presença de coliformes termotolerantes em alimentos indica contaminação pós-processamento, geralmente causada por falta de higienização das mãos de manipuladores. A bactéria *Escherichia coli* é o principal coliforme termotolerante encontrado no trato intestinal de humanos e algumas cepas são patogênicas para o homem (CAMPOS et al., 2009). *E. coli* enteropatogênicas causam diferentes tipos de infecção e são classificadas em vários patótipos, sendo os principais *E. coli* êntero-hemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (MURRAY et al., 2000; PIAZZA, 2005).

Métodos moleculares para diagnóstico de bactérias patogênicas em alimentos estão sendo utilizados como ferramentas mais rápidas e eficazes de diferenciação e identificação de micro-organismos (MALORNY et al., 2002). O desenvolvimento da técnica de amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permite a utilização de sequências específicas do genoma microbiano como marcadores genéticos em nível de gênero, de espécie, e de

subespécie, podendo ser utilizada como uma alternativa viável aos métodos morfológicos e bioquímicos tradicionalmente utilizados (FARBER et al., 2001).

Várias modificações da PCR tem sido descritas, dentre essas, destaca-se a Rep-PCR, que consiste em amplificar regiões entre elementos repetitivos gerando perfis específicos (GANDRA et al., 2008). Essa técnica permite determinar origens de contaminação de micro-organismos patogênicos nos alimentos produzidos em serviços de alimentação como os de hotéis, possibilitando suprir a carência de informações existente nesse ramo de atividade.

Considerando a hipótese de que os cuidados higiênicossanitários não estejam sendo suficientes para garantir a qualidade microbiológica dos alimentos servidos em hotéis, desenvolveu-se este estudo, a fim de avaliar a aplicação das boas práticas em restaurantes hoteleiros em relação ao controle da qualidade microbiológica dos alimentos manipulados e consumidos nestes estabelecimentos, contemplando ainda os seguintes objetivos específicos:

- a) Verificar a adequação às BP do setor de alimentos e bebidas dos hotéis da região sul do RS através da aplicação de *check list* fundamentado na norma RDC 216/2004;
- b) Avaliar a qualidade microbiológica dos alimentos servidos nos restaurantes hoteleiros selecionados para o estudo;
- c) Quantificar *Staphylococcus coagulase positiva* (SCP) e coliformes termotolerantes em amostras de alimentos, em superfícies de utensílios, equipamentos e das mãos de manipuladores, provenientes de restaurantes hoteleiros da região Sul do RS ;
- d) Identificar origens de contaminação dos alimentos fornecidos em hotéis através da técnica de Rep-PCR.

## Revisão de Literatura

### Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) e processos de controle

As DTA são um problema mundial de saúde pública e podem ser causadas por diferentes patógenos através do consumo de água ou alimentos contaminados (STEWART et al., 2003)

Define-se como surto de DTA, o episódio no qual duas ou mais pessoas apresentam, em um determinado período de tempo, sinais e sintomas semelhantes após ingestão de um mesmo alimento, considerado contaminado por evidência clínica-epidemiológica e ou laboratorial (CENEPI, 2001). Em caso de doença grave, como o botulismo e cólera, um único caso é considerado surto (WHO, 2008).

As DTA podem englobar duas grandes categorias: intoxicações alimentares, causadas pela ingestão de alimentos contendo toxinas microbianas pré-formadas, produzidas durante a proliferação de micro-organismos patogênicos nos alimentos, ou infecções alimentares, causadas pela ingestão de alimentos contendo células viáveis de micro-organismos patogênicos, que aderem à mucosa do intestino humano e proliferam colonizando-o, a seguir pode ocorrer à invasão da mucosa e penetração nos tecidos onde causam lesões ou ainda produção de toxinas que alteram o funcionamento das células do trato gastrointestinal, podendo ocorrer em casos mais graves à disseminação no organismo do hospedeiro, levando a septicemia (ROONEY et al., 2004). As manifestações clínicas variam desde um leve desconforto, em caso de doença aguda até reações severas que podem levar à morte ou sequelas crônicas, dependendo da natureza do agente causador, do número de micro-organismos patogênicos ou concentração de substâncias tóxicas ingeridas e da sensibilidade do hospedeiro (RACK et al., 2005).

O Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2013), nos Estados Unidos, relatou que em 2013 foram identificados 19.056 casos de DTA, que resultaram em 4.200 hospitalizações e 80 mortes. No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) identificou 800 surtos de DTA no ano de 2013 (BRASIL, 2014), sendo que *S. aureus* representou 5% dos agentes etiológicos identificados.

Em alguns Estados e Municípios do Brasil, pouco se conhece da real magnitude do problema, pois os casos e surtos de DTA não são notificados. Para caracterizá-los é necessário que a população esteja informada sobre sintomas como diarreias brandas e episódios de vômitos, pois estes são considerados pelo próprio afetado como um “mal estar passageiro” e não necessariamente associados ao consumo de alimentos (SILVA, 2006), o que torna irreal os resultados apresentados nas estatísticas brasileiras (MS, 2005).

Especial atenção deve ser dada à ocorrência de diarreia causada por micro-organismos patogênicos, principalmente as que estão associadas ao consumo de alimento ou água contaminada (PIZZOLITTO et al., 2007). A diarreia aguda afeta milhões de pessoas que viajam para países em desenvolvimento a cada ano (YATES, 2005). Apesar das estratégias desenvolvidas para proteger o turista de uma doença alimentar e de conhecer a patogênese e epidemiologia desta infecção, as porcentagens de infecção continuam altas em núcleos receptores turísticos (YATES, 2005).

Segundo Souza e Silva (2004), o aparecimento de DTA associadas aos serviços de alimentação está intimamente ligado às condições higiênicossanitárias e, principalmente, ao baixo índice de conhecimento das boas práticas de manipulação. Dessa forma, o controle higiênicossanitário tanto dos estabelecimentos quanto dos manipuladores é essencial para garantir a qualidade microbiológica dos alimentos, tornando-se o principal instrumento de defesa contra os surtos de enfermidades veiculadas pelos alimentos. Tal fato foi evidenciado por Bairros (2013) que identificou contagens elevadas de SCP nas mãos de manipuladores que exerciam suas atividades de produção em restaurantes hoteleiros na cidade de Pelotas/RS.

Por isso, torna-se necessária a implantação de ferramentas que assegurem a qualidade nos setores de alimentação, como por exemplo, as Boas Práticas (BP), os Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) e o Programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos Controle (APPCC). Assim, com a implementação dessas ferramentas é possível prevenir problemas considerados críticos. Atualmente, essas estratégias de controle de qualidade são reconhecidas como instrumentos para produção de alimentos seguros e recomendadas por diversas entidades, inclusive pela Organização Mundial da Saúde e o MS (BORGES e FREITAS, 2002).



Conceituam-se as BP como procedimentos que devem ser adotados pelos serviços de alimentação a fim de garantirem a qualidade higiênicossanitária e a conformidade dos alimentos com a legislação sanitária (BRASIL, 2004). O Manual de Boas Práticas (MBP) é um documento que descreve as operações realizadas pelo estabelecimento, incluindo, no mínimo, os requisitos higiênicossanitários dos edifícios, a manutenção e higienização das instalações, dos equipamentos e dos utensílios, o controle da água de abastecimento, de vetores e pragas urbanas, a capacitação profissional, higiene e saúde dos manipuladores, manejo de resíduos e controle e garantia de qualidade do alimento preparado (BRASIL, 2004).

O POP é um procedimento escrito de forma objetiva que estabelece instruções sequenciais para a realização de operações rotineiras e específicas na produção, armazenamento e transporte dos alimentos (BRASIL, 2002). Os serviços de alimentação devem dispor do MBP e dos POP acessíveis aos funcionários envolvidos e disponíveis à autoridade sanitária, quando requeridos (BRASIL, 2004).

Associado ao interesse pelo cumprimento da legislação sanitária, a busca pela qualidade tem motivado várias empresas a normatizar, em manual específico, os processos de produção de alimentos dentro de critérios técnicos definidos pelo método APPCC, a fim de se tornarem mais competitivas em um mercado cada vez mais exigente. Conforme a ANVISA o sistema de APPCC foi desenvolvido para garantir a produção de alimentos seguros à saúde do consumidor, estabelecendo em determinadas etapas (pontos críticos de controle) medidas de controle e monitorização que garantam, ao final do processo, a obtenção de um alimento seguro e de qualidade. O Sistema é recomendado por organismos internacionais como World Health Organization (WHO, 1997) e é exigido pela Comunidade Europeia (EUROPEAN UNION, 2008). No Brasil, a exigência e regulamentação são feitas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2002) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1998). É importante ressaltar que a aplicação do APPCC é exigida na indústria de alimentos, mas não é obrigatório para os serviços de alimentação, para estes é exigido a aplicação das BP e POP.

Embora o APPCC seja um sistema específico para a garantia da inocuidade, da qualidade e da integridade do alimento, não deve ser considerado único e independente. Considera-se o sistema uma ferramenta para controle de processo e não para o ambiente onde o processo ocorre. As BP e os POP constituem os pré-requisitos essenciais à implantação do APPCC (RIBEIRO e ABREU, 2006).

### ***Staphylococcus* spp.**

*Staphylococcus* é um gênero de bactérias da família *Micrococcaceae*, são cocos Gram-positivos, com tamanho que varia entre 0,5 e 1,5  $\mu\text{m}$ , imóveis e não formadores de esporos. A maior parte das espécies apresenta metabolismo respiratório e fermentativo e têm capacidade de fermentar uma grande variedade de carboidratos, principalmente em condições de aerobiose, com produção final de ácido, mas não de gás (KLOOS e BANNERMAN, 1999; FRANCO e LANDGRAF, 2003). Multiplicam-se em uma faixa de pH compreendida entre 4,0 e 9,8, com ótimo entre 6 e 7, apresentam temperatura de crescimento entre 7 a 47,8°C, tolerância a concentrações de 10 a 20% de NaCl e a nitratos, e capacidade de crescer em valores de atividade de água (Aa) de 0,86, apesar de, sob condições ideais, poderem desenvolver-se em valores de Aa de até 0,83 (FRANCO e LANDGRAF, 2002; JAY, 2005).

O gênero *Staphylococcus* é composto por 49 espécies e 26 subespécies (EUZÉBY, 2014), sendo que *S. aureus* é a espécie mais estudada por estar envolvida em surtos de intoxicação alimentar e diversas infecções. O gênero possui ampla distribuição, mas está presente principalmente na pele e microbiota nasal e causa infecções oportunistas em humanos e animais (JAY, 2000).

*Staphylococcus* spp. secretam várias enzimas e toxinas, as quais são responsáveis por uma diversidade de patologias em humanos e animais, causando três síndromes básicas: lesões superficiais, como abscessos da pele e infecções localizadas; infecções sistêmicas, como osteomielite, endocardite, pneumonia, septicemia e síndromes tóxicas; e intoxicação alimentar (ARBUTHNOTT et al., 1990; LINA et al., 1997). Entre as doenças causadas por toxinas, as intoxicações alimentares estafilocócicas merecem

destaque por serem as que mais acometem a população, sendo causadas pela ingestão de enterotoxinas produzidas e liberadas durante a multiplicação da bactéria nos alimentos. Essas enterotoxinas estafilocócicas (EE) são proteínas extracelulares de baixo peso molecular, podendo variar de 26.000 a 29.600 Daltons (NORMANNO et al., 2005), hidrossolúveis, cuja composição em aminoácidos, estrutura molecular e atividade farmacológica são semelhantes, possuindo, entretanto, propriedades imunológicas distintas. São resistentes à hidrólise pelas enzimas gástricas e jejunais (FREIRAS et al., 2004), e são termoestáveis, mantendo as atividades biológicas inalteradas, mesmo após o tratamento térmico usual dos alimentos. Segundo Jay (1996), a produção de enterotoxinas geralmente está relacionada com cepas e/ou espécies de estafilococos que produzem as enzimas coagulase e termonuclease, entretanto, como ressalta o autor, algumas cepas e/ou espécies que não produzem coagulase e/ou termonuclease podem produzir enterotoxinas.

O aparecimento dos sintomas de intoxicação alimentar estafilocócica depende da quantidade, tipo e toxicidade das toxinas, porém, geralmente ocorrem após 4 horas da ingestão do alimento contaminado (BHATIA e ZAHOOR, 2007). Os principais sintomas são náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia, sudorese e diminuição da temperatura corporal, sendo, geralmente, auto limitantes, com duração de 24 a 48 horas (FRANCO e LANDGRAF, 2002).

A relação entre patógenos e hospedeiros é fortemente afetada pela população bacteriana presente (WINZER e WILLIAMS, 2001). De acordo com Holloway (2004), a relação entre a quantidade de bactérias e a produção de toxinas em concentração suficiente para causar uma doença é fundamentada na regulação gênica dependente da densidade populacional, através da produção e liberação no meio externo de pequenas moléculas, chamadas auto indutores em um fenômeno denominado *quorum sensing*.

Além das enterotoxinas, algumas enzimas produzidas como fatores de virulência por determinadas espécies de estafilococos são utilizadas no diagnóstico laboratorial para identificação desse gênero microbiano ou de suas espécies. Entre estas enzimas destacam-se a termonuclease, a catalase e a coagulase. A termonuclease ou endonuclease termoestável (TNase), é uma enzima que pode clivar DNA e RNA e é produzida por *S. aureus*, *S. schleiferi*,

*S. intermedius* e *S. hyicus*. Algumas cepas de *S. epidermidis*, *S. simulans* e *S. carnosus* demonstram uma fraca atividade de termonuclease (KLOOS e BANNERMAN, 1999). Brakstad et al. (1992) descrevem a termonuclease como uma proteína de massa molecular de 17.000 Daltons, capaz de degradar DNA e RNA, com atividade enzimática resistente a 100°C por um período de até uma hora.

A catalase é uma enzima capaz de lisar o peróxido de hidrogênio em duas moléculas de água e uma de oxigênio (O<sub>2</sub>). Algumas células do sistema imune do hospedeiro produzem peróxido de hidrogênio como agente antibacteriano. As bactérias que possuem catalase são capazes de resistir a este mecanismo de defesa, conseguindo sobreviver nas células que invadem (TORTORA et al., 2010). Coagulases são enzimas bacterianas capazes de coagular o fibrinogênio presente no sangue. O fibrinogênio, que é uma proteína do plasma produzida pelo fígado, é convertido pela coagulase em fibrina, formando coágulo. O coágulo atua protegendo a bactéria dos fagócitos e a isola das outras defesas do hospedeiro (TORTORA et al., 2010). Várias enzimas como a lipase, estearase, desoxirribonuclease, estafiloquinase, hialuronidase e fosolipase são excretadas pelos SCP. Clinicamente a mais importante é a estafiloquinase que permite o rompimento do coágulo e a liberação da bactéria quando o ambiente se tornar mais propício a sua sobrevivência no hospedeiro (BIBERSTEIN, 1990). A importância da pesquisa de SCP em alimentos se deve ao fato de que os *Staphylococcus* que produzem coagulase também são capazes de sintetizar enterotoxinas (JAY, 2000).

### ***Staphylococcus coagulase positiva (SCP)***

Entre as 49 espécies de *Staphylococcus*, sete são capazes de produzir coagulase: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi*, *S. hyicus*, *S. lutrae*, *S. delphini*, *S. pseudintermedius* (DEVRIESE et al., 2005). Dessas sete espécies, apenas *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* foram descritas como produtoras de enterotoxinas e associadas a surtos de intoxicação alimentar (BECKER, 2001). Além disso, essas três espécies apresentam outras semelhanças, como a capacidade de produzir a enzima termonuclease (JAY, 1996; KLOOS e BANNERMAN, 1999). Com relação às demais espécies coagulase positiva,

não há relato de seu isolamento em alimentos nem de seu envolvimento em casos de intoxicação alimentar (KLOOS e BANNERMAN, 1999).

*S. aureus* é um dos mais importantes patógenos que causam infecções clínicas e que estão envolvidos em casos de intoxicação alimentar (CHIANG et al., 2008) e segundo Soares et al. (2012) essa espécie tem sido a terceira mais importante causa de doenças microbianas transmitidas por alimentos em todo o mundo, sendo responsável por quase 45% de todas toxinfecções registradas. As peculiaridades do seu habitat tornam sua presença amplamente distribuída na natureza, sendo transmissíveis aos alimentos pelos animais, principalmente o gado leiteiro com mastite, e por manipuladores de alimentos, na maioria portadores assintomáticos (BALABAN e RASOOLY, 2000). Novak (1999) relata que *S. aureus* enterotoxigênicos podem ser carregados para os alimentos, durante ou após o processamento, através do manuseio inadequado e que a refrigeração insuficiente, possibilita o crescimento do micro-organismo e a produção e liberação de enterotoxinas no alimento. Dessa forma, sua presença em alimentos processados indica contaminação dos manipuladores, bem como limpeza e sanitização inadequadas de superfícies, utensílios, materiais e equipamentos (SIQUEIRA, 1995).

Em 1976, uma nova espécie de *Staphylococcus* foi isolada de animais, a espécie *S. intermedius*, encontrada em pombos, cães, raposas e cavalos. Habita comumente a cavidade oral, nasal e pele de animais saudáveis, podendo causar doença invasiva (HÁJEK, 1976). Nos seres humanos, *S. intermedius* é reconhecido como um agente patogênico invasivo e tem sido isolado em 18% de ferimentos causados por canino (LEE, 1994). *S. hyicus* pode apresentar tanto reação positiva quanto negativa no teste da coagulase. Conforme Motta et al. (2011), *S. hyicus* foi reconhecido como agente patogênico em diferentes espécies animais, causando, por exemplo, epidermite exsudativa em suínos, uma doença aguda que acomete suínos lactentes e recém desmamados. Segundo Bandeira (2001), *S. hyicus*, juntamente com *S. aureus* é, muitas vezes, a bactéria predominantemente encontrada em rebanhos leiteiros com problemas de mastite. JAY (2005) ressalta a capacidade enterotoxigênica dessa espécie, fato comprovado por Valle et al. (1990), que verificaram a produção de EEC por cepas de *S. hyicus* coagulase

positiva isoladas de ovinos. Da mesma forma, Hoover et al. (1983) isolaram cepas de *S. hyicus* que produziam EEA, EEB, EEC, EED e EEE.

Durante muitos anos, associou-se a capacidade de produzir coagulase, termonuclease e enterotoxinas apenas à *S. aureus*. Por isso, os testes laboratoriais para pesquisa de estafilococos, assim como as legislações que estipulavam os limites para bactérias patogênicas em alimentos, eram direcionadas, especificamente, para esta espécie (SILVA et al., 2001). A mudança no conceito de associar intoxicação alimentar estafilocócica apenas à *S. aureus* começou com a descoberta de que outras espécies, como *S. hyicus* e *S. intermedius*, apresentavam capacidade de produzir enterotoxinas, conforme já mencionado. Além disso, esses três micro-organismos produzem coagulase e termonuclease e apresentam características morfológicas muito semelhantes, quando semeados em meios seletivos e diferenciais (GANDRA et al., 2005). Estes fatos levaram à mudança da legislação brasileira, estabelecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pela ANVISA, do MS, que passou a estipular limites para contagem de SCP e não mais apenas para *S. aureus* (BRASIL, 1996; 1997; 2000; 2001).

Marques et al. (2006) identificaram espécies de *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* isolados de leite de vaca e queijo, demonstrando que a contaminação dos alimentos por cepas patogênicas pode resultar em problemas para a saúde pública, bem como em prejuízos para a indústria de alimentos.

### **Coliformes termotolerantes**

Os coliformes termotolerantes constituem um grupo de enterobactérias da família Enterobacteriaceae, Gram negativas, anaeróbicas facultativas, não-esporuladas, capazes de fermentar lactose com produção de ácido e gás a temperatura de 45°C em um período de 48 horas (JAY, 2005). *Escherichia coli* e algumas cepas do gênero *Klebsiella* e *Enterobacter* pertencem a este grupo de bactérias. Embora somente *E. coli* tenha como habitat primário o intestino de humanos e de outros animais, o grupo é usado como indicador de condições higiênicossanitárias durante o processamento e armazenamento de alimentos. *Kebsiella* e *Enterobacter* podem ser encontrados em outros

ambientes, como vegetais e solo, onde persistem por tempo superior ao das bactérias patogênicas de origem intestinal (SILVA et al., 2006).

Os coliformes termotolerantes podem ser transmitidos ao alimento pelas mãos de manipuladores com hábitos de higiene insatisfatórios, por insetos voadores ou rasteiros ou pela água (JAY, 2005).

*E. coli* está distribuída no intestino de crianças saudáveis, adultos e outros mamíferos, entretanto, algumas cepas apresentam potencial patogênico sugerindo a aquisição de genes de virulência de cepas comensais, mutações, ou transferência horizontal de determinantes gênicos, durante o processo evolutivo da espécie. As cepas patogênicas são divididas em patotipos, de acordo com os fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiologia das doenças específicas que causam (MADIGAN et al., 2010). Segundo Huang et al. (2006), existem seis classes de *E. coli* patogênicas que podem causar gastroenterites, porém as principais são: *E. coli* êntero-hemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC).

A designação de *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC) foi inicialmente utilizada por cepas de *E. coli* pertencentes ao sorotipo O157:H7 causadores de colite hemorrágica (CVE, 2000). EHEC tem como mecanismo de patogenicidade a produção de citotoxinas *Shiga*, assim denominadas por serem muito semelhantes à toxina do bacilo *Shigella*. Podem também ser denominadas verotoxinas (VTs), já que sua atividade biológica pode ser observada em cultivos de células Vero, de rim de macaco. Suas cepas têm características diferentes do gênero, dentre elas a dificuldade ou não crescimento em temperaturas normalmente empregadas para pesquisa de *E. coli* no alimento (44,5°C/ 45°C) e a dose infectante necessária ser baixa (10 a 100 bactérias) (FDA, 2014). Essas bactérias causam alterações nos citoesqueletos das células epiteliais do intestino com destruição da mucosa e acúmulo de actina no local da lesão. Observa-se lesão nos vasos sanguíneos das microvilosidades, justificando o sangue nas fezes. Os sintomas são caracterizados por dores abdominais, diarreia aguda com sangue e ausência de febre (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Estima-se que aproximadamente 15% das infecções por *E. coli* O157:H7 possam apresentar uma complicação chamada Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), caracterizada pela lise dos

eritrócitos e falência renal (CVE, 2000). Os bovinos são o reservatório natural de EHEC, por isso a ocorrência parece estar diretamente relacionada com a carne bovina (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Gastroenterite é o nome comum da doença causada pela *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), apesar de ser conhecida popularmente como “diarreia do viajante”. A dose infectante ( $10^6$  a  $10^8$  células) para ocorrer à doença é elevada (FDA, 2014). As cepas de ETEC aderem-se à mucosa intestinal e a colonizam, excretando para o interior da célula do hospedeiro enterotoxinas termoestáveis (ST) e/ou termolábeis (LT) que levam à diarreia aquosa (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Sua transmissão é fecal-oral através de alimentos e águas contaminados. Embora a maioria dos pacientes com infecção por essa bactéria apresente diarreia aquosa normalmente sem febre, algumas vezes pode ocorrer sangue nas fezes. A infecção é geralmente auto-limitante, durando de três a sete dias, após um período de incubação de um a três dias.

A doença causada por *E. coli* enteropatogênica (EPEC) é conhecida como diarreia infantil, sendo os recém-nascidos e lactentes jovens os mais acometidos. EPEC coloniza o intestino delgado, promove modificação na estrutura das microvilosidades e adere-se intimamente à célula hospedeira, originando lesões que resultam em redução da capacidade de absorção intestinal, denominada *attaching and effacing* (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

*E. coli* enteroinvasora (EIEC) acomete crianças e adultos. Os surtos estão relacionados com a transmissão interpessoal (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Apresentam características próprias, como não possuir flagelos, fermentar tardiamente ou não utilizar a lactose. São capazes de penetrar nas células epiteliais e causar manifestações clínicas semelhantes às infecções causadas por *Shigella*, apesar de não produzirem Shiga toxina. EIEC internaliza-se no enterócito onde modifica o citoesqueleto, rompe a célula, multiplica-se e invade outras células. No local da invasão ocorre acúmulo de actina que ocasiona morte da célula. Os sintomas são disenteria, cólicas abdominais, febre, mal estar geral, com eliminação de sangue e muco nas fezes (FRANCO e LANDGRAF, 2008).



## **Técnicas moleculares para identificação e diferenciação de espécies bacterianas**

Métodos moleculares para diagnóstico de bactérias patogênicas em alimentos estão sendo utilizados como ferramentas rápidas e eficazes de diferenciação e identificação de micro-organismos. Dentre esses, destaca-se a amplificação de sequências do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) (MALORNY et al., 2002). Desenvolvida primeiramente por Kary B. Mullis, em 1985, esta técnica permite obter milhões de cópias de um segmento específico de DNA através da ação da enzima *Taq* DNA polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) sobre um DNA molde. É realizada em um equipamento automatizado e computadorizado, denominado termociclador, que promove a alternância de temperaturas por determinados períodos de tempo, possibilitando a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do DNA (KONEMAN et al., 2001). Na última década, a PCR tornou-se a técnica genética mais utilizada em diagnóstico microbiológico (MALORNY et al., 2002).

O aprimoramento de metodologias baseadas em PCR possibilitou a inserção de técnicas para a identificação e tipificação de micro-organismos e, dependendo da especificidade de detecção desejada (gênero, espécie, subespécie), podem ser utilizadas diferentes regiões do genoma (MALORNY et al., 2002). A PCR de elementos repetitivos (rep-PCR) tem sido utilizada de maneira crescente para subtipificação bacteriana (FARBER et al., 2001). A rep-PCR pode ser gerada pela determinação da presença de sequências repetidas que estão distribuídas no genoma através da PCR de elementos palindrômicos extragênicos repetitivos (Rep-PCR), sequências intergênicas enterobacterianas repetitivas de consenso (ERIC-PCR), elementos BOX (BOX-PCR), politrinucleotídeo (GTG)<sub>5</sub>, bem como da composição dos dados de mais de uma dessas técnicas, de forma a compor um único perfil molecular (KUDIRKIENE et al., 2009; WILSON et al., 2009). Chavapal et al. (2006) avaliaram a técnica de rep-PCR no monitoramento da qualidade do leite de vaca através do rastreamento de *Staphylococcus aureus* na linha de produção de leite avaliando algumas fontes de contaminação e concluíram a eficiência dessa técnica para análise da similaridade entre micro-organismos da mesma

espécie, podendo ser utilizada para investigação de falhas no processamento de alimentos e para elaboração de métodos de controle mais eficientes para evitar e/ou diminuir a disseminação de micro-organismos patogênicos.

**Projeto de Pesquisa**

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE NUTRIÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS**



**AVALIAÇÃO DAS BOAS PRÁTICAS E IDENTIFICAÇÃO DAS FONTES DE  
CONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS SERVIDOS EM RESTAURANTES  
HOTELEIROS**

**PELOTAS**

**2014**

**MESTRANDA – ALINE DE OLIVEIRA RODRIGUES**

**AVALIAÇÃO DAS BOAS PRÁTICAS E IDENTIFICAÇÃO DAS FONTES DE  
CONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS SERVIDOS EM RESTAURANTES  
HOTELEIROS**

**EQUIPE:**

Mestranda: Aline de Oliveira Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Claudio Dias  
Timm

Coorientadores: Prof. Dra. Rita de  
Cássia e Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra

**Pelotas  
2014**

## Resumo

RODRIGUES, Aline Oliveira de. **AVALIAÇÃO DAS BOAS PRÁTICAS E IDENTIFICAÇÃO DAS FONTES DE CONTAMINAÇÃO DOS ALIMENTOS SERVIDOS EM RESTAURANTES HOTELEIROS**. (2014). Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O estilo de vida atual contribui para o aumento da procura por serviços de alimentação em todo mundo, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil. O setor hoteleiro vem se expandindo a cada ano e dentre os serviços oferecidos, a gastronomia é um dos mais requisitados, a qual busca a satisfação do cliente, oferecendo produtos seguros e de qualidade. Este estudo tem como objetivo avaliar a aplicação das boas práticas em restaurantes hoteleiros da cidade de Pelotas/RS e Rio Grande/RS e relacioná-la com a qualidade microbiológica dos alimentos oferecidos, além de identificar fontes de contaminação. Será verificada a adequação do setor de alimentos e bebidas de cada hotel participante quanto às condições higiênico-sanitárias através da aplicação de *check list*, conforme Resolução nº 216/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Através da coleta de amostras de superfícies, utensílios, equipamentos e mãos de manipuladores, será investigada a população de bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e Coliformes termotolerantes. Os critérios referentes a limites microbiológicos serão avaliados conforme recomendação descrita no Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, editado pela American Public Health Association. Após obtenção dos isolados, será feita análise molecular para identificação das espécies *Staphylococcus* coagulase positiva e dos patótipos de *E. coli*, utilizando multiplex PCR. Para diferenciação de cepas dentro da mesma espécie ou patótipo, os isolados serão analisados pela rep-PCR, utilizando o *primer* (GTG)<sub>5</sub>.

**Palavras chave:** segurança dos alimentos, *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes termotolerantes, multiplex-PCR, rep-PCR.

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, uma das importantes mudanças observadas nos hábitos alimentares da população de diversos países é o aumento no consumo de alimentos fora dos domicílios (SANTOS *et al.*, 2010). O estilo de vida atual contribui para o aumento da procura por serviços de alimentação em todo mundo, principalmente em países em desenvolvimento. No Brasil, a ampliação deste setor de serviço tem ocorrido numa taxa de 20% ao ano (SÃO JOSÉ *et al.*, 2011).

O mercado hoteleiro vem se expandindo mundialmente a cada ano, oferecendo diversos serviços, entre eles o de alimentos e bebidas, sendo este de fundamental importância devido à necessidade de produzir alimentação balanceada e segura a fim de proporcionar a satisfação do cliente (SOUZA *et al.*, 2009). Frente à crescente valorização do setor, competitividade e preocupação com o consumidor, é essencial que os estabelecimentos busquem se destacar por meio da qualidade dos produtos e serviços ofertados. A gastronomia é um dos serviços mais requisitados no setor hoteleiro e para atender as expectativas dos clientes é necessário que os estabelecimentos manipuladores e/ou processadores de alimentos formulem estratégias higiênico-sanitárias que contemplem desde a seleção de fornecedores de matéria-prima até a entrega do produto final ao consumidor, de forma a garantir a segurança e a qualidade dos alimentos (FONSECA *et al.*, 2010).

Para o aperfeiçoamento constante das ações de controle sanitário com o objetivo de monitorar e minimizar os riscos originados pela ingestão de alimentos contaminados, é necessária a implementação das Boas Práticas (BP) que, de maneira geral, preconizam a análise de quatro pontos: higiene pessoal, instalações, equipamentos e controle de produção (SEIXAS *et al.*, 2008). As BP são obrigatórias pela legislação brasileira para todas as indústrias e estabelecimentos produtores de alimentos e estão pautadas nas Portarias nº 1428/93 (BRASIL, 1993), nº 368/97 (BRASIL, 1997) e nº 78/2009 (RS, 2009), e nas Resoluções da Direção Colegiada RDC nº 275/2002 (BRASIL, 2002) e nº 216/2004 (BRASIL, 2004).

Uma importante ferramenta utilizada para a avaliação das BPF é a lista de verificação ou *check list*, determinada pela Agência Nacional de Vigilância

Sanitária (ANVISA), que permite fazer uma avaliação preliminar das condições higiênico-sanitárias de um estabelecimento produtor de alimentos (SEIXAS *et al.*, 2008).

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são micro-organismos encontrados nas fossas nasais de humanos e também em suas mãos, sendo consideradas a terceira maior causa de doenças transmitidas por alimentos (DTA) (SOARES *et al.*, 2012). Segundo o Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC, 2006), a espécie *S. aureus* é capaz de produzir diferentes toxinas que frequentemente causam intoxicação alimentar. Esta bactéria é comumente transferida para os alimentos através do contato com os manipuladores. Além de *S. aureus*, também *S. hyicus* e *S. intermedius* têm sido associados a surtos de intoxicação de origem alimentar, sendo estas três espécies as de maior interesse em microbiologia de alimentos (FRANCO e LANDGRAF, 2003). Estes micro-organismos são capazes de produzir a enzima coagulase, característica que é utilizada para a realização das suas contagens em alimentos (BRASIL, 2003).

A presença de coliformes termotolerantes em alimentos indica contaminação pós-processamento, geralmente causada por falta de higienização das mãos de manipuladores. A bactéria *Escherichia coli* é o principal coliforme termotolerante encontrado no trato intestinal de humanos e algumas cepas são patogênicas para o homem (CAMPOS *et al.*, 2009). *E. coli* enteropatogênicas causam diferentes tipos de infecção e são classificadas em vários patotipos, sendo os principais *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (MURRAY *et al.*, 2000; PIAZZA, 2005).

Marin *et al.* (2006) descrevem que os métodos tradicionais de detecção de micro-organismos em alimentos, embora confiáveis e eficientes, requerem vários dias a semanas para obtenção dos resultados. Também ressaltam que as propriedades fenotípicas pelas quais as bactérias são identificadas podem não ser expressas ou difíceis de serem interpretadas e classificadas, além da possibilidade de existência de células viáveis, porém não cultiváveis.

Nas últimas décadas verificou-se aumento significativo no desenvolvimento de técnicas moleculares para detecção, identificação e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos. Avanços nos estudos

de biologia molecular propiciam o desenvolvimento e emprego de vários métodos de subtipagem molecular. Dentre esses, destacam-se as fundamentadas na amplificação de sequências do DNA pela reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR), tais como Multiplex-PCR, que é utilizado para amplificar de modo simultâneo sequências alvo de diferentes micro-organismos patogênicos em uma única reação, e rep-PCR que consiste em amplificar regiões entre elementos repetitivos gerando perfis específicos (GANDRA *et al.*, 2008).

Essas técnicas são alternativas viáveis às técnicas tradicionais para o controle microbiológico em processos alimentícios que nos possibilita identificar espécies de micro-organismos patogênicos e determinar suas fontes de contaminação nos alimentos produzidos em serviços de alimentação como os de hotéis, possibilitando suprir a carência de informações existente nesse ramo de atividade.



## **2. HIPÓTESE**

Os restaurantes hoteleiros da cidade de Pelotas/RS e Rio Grande/RS não adotam as boas práticas de manipulação, conforme exigido pela legislação brasileira e ultrapassam os limites microbiológicos aceitáveis para os produtos fornecidos, sendo possível identificar espécies *Staphylococcus coagulase* positiva e patótipos de *E. coli*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

- ✓ Avaliar a aplicação das boas práticas de fabricação em restaurantes hoteleiros em relação ao controle da qualidade microbiológica dos alimentos.

#### 3.2 Específicos

- ✓ Verificar a adequação do setor de alimentos e bebidas dos hotéis através da aplicação de *check list*;
- ✓ Investigar a qualidade microbiológica dos alimentos servidos nos restaurantes;
- ✓ Identificar espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva e de patótipos de *E. coli* em amostras de alimentos servidos em restaurantes hoteleiros, em superfícies de utensílios, equipamentos e das mãos de manipuladores;
- ✓ Quantificar *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes em amostras de alimentos, em superfícies de utensílios, equipamentos e das mãos de manipuladores, provenientes de restaurantes hoteleiros;
- ✓ Estabelecer perfis moleculares para cepas de *S. aureus* e *E. coli* isoladas de alimentos;
- ✓ Identificar fontes de contaminação dos alimentos fornecidos em hotéis.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Estabelecimentos comerciais**

Serão coletadas amostras em duplicata de quatro hotéis, produtores de alimentação das cidades de Rio Grande e Pelotas, Rio Grande do Sul, com intervalo entre as coletas de no mínimo 30 dias. Para que o estabelecimento participe do trabalho e ocorra a aplicação do *check list* (Apêndice A) e a coleta do material para análise, o proprietário ou o responsável administrativo pelo estabelecimento deverá, após tomar ciência do projeto, assinar um Termo de Autorização (Apêndice B). Dois colaboradores de cada unidade que trabalhem diretamente com a preparação dos alimentos serão convidados a participar da pesquisa e receberão informações sobre o projeto. Se concordarem em participar, assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice C).

### **4.2 Avaliação das Boas Práticas de Fabricação**

Será aplicada a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação da Anvisa (anexo III) que contempla os seguintes itens: identificação da empresa, edificações e instalações (área interna e externa), controle de pragas, equipamentos, móveis e utensílios, manipuladores, controle de produção, transporte de alimentos e registros (Brasil, 2004). Todos os itens serão avaliados visualmente em uma única visita, pelo mesmo observador.

Cada estabelecimento será qualificado de acordo com a proporção de não conformidades, conforme observado no *check list*, seguindo a seguinte classificação: ótimo (0 a 25% de não conformidades), bons (25 a 50% de não conformidades) e ruins (>50% de não conformidades).

### **4.3 Coleta de amostras**

De cada estabelecimento, serão coletadas cinco amostras de aproximadamente 200 g de alimento, dando-se preferência para alimentos de origem láctea, tais como: queijo ricota, queijo mussarela, bebida láctea, doce de leite e salada de frutas, os quais, de uma forma geral, propiciam ambientes

favoráveis à multiplicação de bactérias do gênero *Staphylococcus* e de coliformes termotolerantes. As amostras serão coletadas com utensílios estéreis e acondicionadas em sacos também estéreis. Para a avaliação da higiene de manipuladores, superfícies e equipamentos serão coletadas amostras das mãos dos manipuladores (uma da mão direita e outra da esquerda), bancadas onde o alimento é manipulado (uma amostra), tábuas de corte (uma amostra) e fatiador de frios (uma amostra) utilizando zaragatoas estéreis levemente umedecidas em água peptonada 0,1% estéril, de acordo com as recomendações da American Public Health Association (APHA, 2001). Para a coleta das mãos, a zaragatoa será friccionada em movimentos giratórios da parte inferior da palma direita, até a extremidade dos dedos, repetindo-se esse procedimento três vezes na direção de cada dedo, já nas bordas, será passada a zaragatoa em movimento de vai e vem avançando em um dos lados da mão onde a linha do punho se inicia, passando entre os dedos e, ao final, do outro lado da mão até o punho. Para as amostras das superfícies de bancadas, tábuas de corte e fatiador de frios, a zaragatoa será friccionada em uma área de 100 cm<sup>2</sup> delimitada através de gabarito de aço inoxidável esterilizado. A área de amostragem das bancadas será delimitada na região central, assim como para tábuas de corte. Para o cortador de frios a área de amostragem será a lamina de corte. As zaragatoas serão colocadas em tubos contendo 10 mL de água peptonada 0,1% estéril. O material coletado será acondicionado em caixas isotérmicas com gelo e imediatamente encaminhado ao laboratório para análise.

A tabela 1 demonstra o delineamento experimental com a quantidade total de amostras coletadas em cada hotel pesquisado.

Tabela 1 – Delineamento experimental do projeto de pesquisa.

<b>Hotéis</b>	<b>N° de amostras</b>
Hotel 1	12
Hotel 2	12
Hotel 3	12
Hotel 4	12
<b>Total</b>	<b>48</b>
<b>Total geral</b>	<b>48 x 2 = 96</b>

#### 4.4 Contagens bacterianas

As amostras serão analisadas através de contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva e de coliformes termotolerantes, conforme os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal recomendados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003). Para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, diluições seriadas das amostras serão semeadas em duplicata em ágar Baird-Parker (Himedia, Mumbai, India) e incubadas a 37 °C por 48 h. Cinco colônias típicas e cinco atípicas de cada placa serão inoculadas em Infusão de Cérebro e Coração (Himedia) e incubadas a 37 °C por 24 h para realização da prova da coagulase, que consistirá na mistura de 0,3 mL de cada cultura com 0,3 mL de plasma de coelho e incubação a 37 °C por 6 h para observação de coagulação. Será calculada a proporção de colônias coagulase positivas em relação à contagem de colônias típicas e atípicas na placa e o resultado final da contagem de cada placa será obtido pela soma do número de colônias coagulase positivas. Após, será calculada a média das duplicatas e realizada a correção da diluição utilizada para a contagem. As contagens de coliformes termotolerantes serão realizadas através da técnica do Número Mais Provável (NMP). Um microlitro de cada diluição será inoculado em séries de três tubos de ensaio com um tubo de Durhan invertido no seu interior contendo caldo Lauril Sulfato de Sódio (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil). Após incubação a 37°C por 48h, será verificado o crescimento presuntivo coliformes, indicado

pela formação de gás no interior do tubo de Durham. Para análise confirmativa de coliformes termotolerantes, será feita inoculação, a partir dos tubos positivos na etapa anterior, em tubos de ensaio com tubos de Durham contendo caldo EC (Acumedia, Michigan, EUA) e incubação a 45°C por 48 h. Após, será observada a produção de gás em cada tubo e o resultado final será obtido através de tabela específica para NMP.

#### 4.5 Obtenção dos isolados

Três colônias de *Staphylococcus* coagulase positiva obtidas das placas das contagens serão inoculadas em Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia) e incubadas a 37 °C por 24 h. A partir das culturas nos tubos do NMP, uma alçada será semeada por esgotamento em ágar MacConkey (Acumedia, Lansing, Michigan, USA). Após incubação a 37 °C por 24 h, três colônias lactose positivas e três lactose negativas serão semeadas em BHI e incubadas a 37 °C por 24 horas. As culturas em BHI serão misturadas com 20% de glicerol, para manutenção de estoque a -70 °C. Os isolados serão recuperados em BHI a 37 °C por 24 h, quando necessário.

#### 4.6 Extração de DNA

O DNA dos isolados será extraído conforme Sambrook e Russel (2001). Resumidamente, o *pellet* obtido por centrifugação de 1 mL de cultura em APA ou BHI será ressuspenso em 100 µL de tampão STES [Tris-HCl 0,2 M, NaCl 0,5 M, SDS 0,1% (m/v), EDTA 0,01 M, pH 7,6]. Serão adicionados 50 µL de pérolas de vidro e 100 µL de fenol/clorofórmio. Após homogeneização por 1 min, a mistura será centrifugada a 13.000 g por 5 min. O sobrenadante será coletado e precipitado em 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de NaCl 5M a -70 °C por 30 min. Uma nova centrifugação será realizada a 13.000 g por 20 min, o sobrenadante será descartado e o *pellet* lavado com etanol a 70%. Após eluição em 40 µL de tampão de eluição (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4), será adicionado 1 µL de RNase (10 µg/µL). O DNA extraído será estocado a -70 °C.

#### 4.7 Identificação das espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva

A identificação das espécies *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* será feita através de análise do DNA dos isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva através de multiplex PCR, pesquisando a presença do gene *nuc* com uso dos *primers* representados na Tabela 2. Será utilizado o protocolo relatado por Takashi *et al.* (2010). Cada reação de 50 µL conterá 2 µL de DNA extraído, 2 U de *Taq* DNA polimerase, 10 pmol de cada primer, 0,2 mM de desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP) e um tampão de reação. A amplificação será realizada a 95 °C por 2 min, 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 56 °C por 30 s e 72 °C por 1 min, e extensão final a 72 °C por 2 min. Os produtos da PCR serão corados com GelRed e analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%.

Tabela 2 - *Primers* utilizados na identificação das espécies de *Staphylococcus*.

<i>Primer</i>	Sequência (5' a 3')	Gene alvo	Tamanho da amplificação (pb)	Espécie
au-F3	TCGCTTGCTATGATTGTGG	<i>nuc</i>	359	<i>S. aureus</i>
au-nucR	GCCAATGTTCTACCATAGC			
in-F	CATGTCATATTATTGCGAATGA	<i>nuc</i>	430	<i>S. intermedius</i>
in-R3	AGGACCATCACCATTGACATATTGAA ACC			
hy-F1	CATTATATGATTTGAACGTG	<i>nuc</i>	793	<i>S. hyicus</i>
hy-R1	GAATCAATATCGTAAAGTTGC			

#### 4.8 Identificação dos patotipos de *E. coli*

Os patotipos EPEC, EHEC, ETEC e EIEC serão identificados através da análise do DNA dos isolados suspeitos de serem *E. coli* através de multiplex

PCR, pesquisando a presença dos genes *eae* para EPEC, *stx* para EHEC, *elt* e *est* para ETEC, e *ipaH* para EIEC, com uso dos *primers* relacionados na Tabela 3. Será utilizado o protocolo de amplificação relatado por Toma *et al.* (2003). Resumidamente, cada reação de 50  $\mu$ L conterá 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 50 mM de KCl; Triton X-100 a 0,1%; 1,5 mM de  $MgCl_2$ ; 2,5 U de *Taq* DNA polimerase recombinante (AmpliTaq Gold; Applied Biosystems); 200  $\mu$ M de desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP); 5  $\mu$ L de DNA e 0,125  $\mu$ M de cada *primer* SK1, SK2, ipaIII e ipaIV; 0,25  $\mu$ M de cada *primer* VTcom-u, VTcom-d, LT<sub>L</sub> e LT<sub>R</sub>; 0,5  $\mu$ M de cada *primer* AL65 e AL125 e água suficiente para completar o volume da reação. A amplificação será realizada a 95 °C por 1 min, 52 °C por 1 min e 72 °C por 1 min, por 30 ciclos e extensão final a 72 °C por 10 min. A eletroforese dos produtos da PCR corados com GelRed será realizada em gel de agarose a 2,5%.



Tabela 3 - *Primers* utilizados na identificação dos patótipos de *E. coli*.

<i>Primer</i>	Sequência (5' a 3')	Gene alvo	Tamanho da amplificação (pb)	Referências
SK1	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	<i>eae</i>	881	Oswald <i>et al.</i> (2000)
SK1	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCCG			
VTcom- u	GAGCGAAATAATTTATATGTG	<i>stx</i>	518	Yamasaki <i>et al.</i> (1996)
VTcom- d	TGATGATGGCAATTCAGTAT			
AL65	TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG	<i>est</i>	147	Hornes <i>et al.</i> (1991)
AL125	CCTGACTCTTCAAAAGAGAAAATTAC			
LT <sub>L</sub>	TCTCTATGTGCATACGGAGC	<i>elt</i>	322	Tamanai-Shacoori e Jolivet-Gougeon (1994)
LT <sub>R</sub>	CCATACTGATTGCCGCAAT			
ipaIII	GTTCCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGT C	<i>ipaH</i>	619	Sethabutr <i>et al.</i> (1993)
ipaIV	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC			

#### 4.9 Rep-PCR

Para diferenciação de cepas dentro da mesma espécie ou patotipo, os isolados serão analisados pela rep-PCR, utilizando o *primer* (GTG)<sub>5</sub>, o qual, segundo Braem *et al.* (2011) e Mohapatra *et al.* (2007), apresenta elevado poder de discriminação para *Staphylococcus* spp. e *E. coli*, respectivamente. A técnica será realizada de acordo com Versalovic *et al.* (1994). Resumidamente, cada reação de 25 µL conterà 2 U de *Taq* DNA polimerase; 1,25 mM de cada dNTPs; 100 ng de DNA; 50 pmol de cada *primer*, um tampão de reação com 10% de DMSO; 335 mM de Tris-HCl; 33,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 33,5 µM de EDTA; 83 mM de acetado de amônia; 150 mM β-Mercaptoetanol; 850 µg/ml de albumina sérica bovina; pH 8,8 e água suficiente para completar o volume da reação. A amplificação será realizada a 95 °C por 7 min, 30 ciclos de 90 °C por 30 s, 95 °C por 1 min e extensão final a 65 °C por 16 min. A eletroforese dos produtos da PCR corados com GelRed será realizada em gel de agarose a 1%.



## **6. COMITÊ DE ÉTICA**

O projeto será submetido à aprovação do comitê de ética da Universidade Federal de Pelotas, pois serão avaliadas mãos de manipuladores de alimentos dos estabelecimentos participantes.

## 7. ORÇAMENTO

Na tabela 4 encontra-se o orçamento com a descrição dos itens necessários para a execução do projeto.

Tabela 4 – Orçamento dos itens para realização do projeto de pesquisa.

<b>Descrição</b>	<b>Valor total (R\$)</b>
Materiais de laboratório	800,00
Materiais de consumo	200,00
Materiais para análise molecular	2.300,00
Meios de cultura	1.200,00
Diluentes	300,00
<b>Total</b>	<b>4.800,00</b>

## 8. REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION [APHA]. Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: APHA, 2001. 676 p.

BRAEM, G.; DE VliegHER, S.; SUPRÉ, K.; HAESEBROUCK, F.; LEROY, F.; DE VUYST, L. (GTG)<sub>5</sub>-PCR fingerprinting for the classification and identification of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine milk and teat apices: A comparison of type strains and field isolates. **Veterinary Microbiology**, n. 147, p. 67-74, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n.º 1428 de 26 de novembro de 1993. Dispõe sobre o controle de qualidade na área de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2 dez. 1993, Seção I, p. 18415-18419.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n.º 368 de 04 de setembro de 1997. Dispõe sobre regulamento técnico das condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 8 set. 1997. Seção I, p. 19697.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos e a lista de verificação de boas práticas de fabricação em estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 06 nov. 2002. Seção I, p. 4-21.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26/08/2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 set. 2003. Seção I, p. 14-51.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º 216 de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre regulamento técnico de boas práticas para serviço de alimentação. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 set. 2004. Seção I, p. 25.

CAMPOS, A.K.C.; CARDONHA, A.M.S.; PINHEIRO, L.B.G.; FERREIRA, N.R.; AZEVEDO, P.R.M.; STAMFORD, T.L.M. Assessment of personal hygiene and practices of food handlers in municipal public schools of Natal, Brazil. **Food control**, n. 20, p. 807-810, 2009.

CDC – CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2006. Staphylococcal food poisonig. Disponível em: <[www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/staphylococcus\\_food\\_g.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/staphylococcus_food_g.htm)>. Acesso em: 30 ago. 2013.

FONSECA, M.P.; MANFRIDINE, L.A.; SÃO JOSÉ, J.F.B.; TOMAZINI, A.P.B.; MARTINI, H.C.D.; RIBEIRO, L.C.L.; SANT'ANA, H.M.P. Avaliação das condições físico-funcionais de restaurantes comerciais para implementação das boas práticas. **Alimentação e Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 251-257, 2010.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Micro-organismos patogênicos de importância em alimentos. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 33-81, 2003.

GANDRA, E. A.; GANDRA, T. K. V.; MELLO, W. S. GODOI, H. S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Maringá**, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

MARIN, V. A. et al. Detecção de patógenos presentes nos alimentos: A falta de padronização e avaliação de métodos moleculares no Brasil. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n.145, p. 46-50, 2006.

MOHAPATRA, B.R.; BROERSMA, K.; MAZUMDER, A. Comparison of the five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. **FEMS Microbiology Letters**, v. 277, p. 98-106, 2007.

MURRAY, P.R. Enterobacteriaceae. In: MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

PIAZZA, R.M.F.; TADDEI, C.R.; FRANZOLIN, M.R.; BUERIS, V.; ELIAS Jr., W.P. Infecções intestinais causadas por *Escherichia coli* – Aspectos microbiológicos. In: FOCACCIA, R.V.; VERONESI, R. **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu, p. 1101-1105, 2005

RS (2009). Secretaria da saúde do estado do Rio Grande do Sul. Portaria nº 78 de 30 de janeiro de 2009. Dispõe sobre a lista de verificação em boas práticas para serviços de alimentação, aprova normas para cursos de capacitação em boas práticas para serviços de alimentação e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Porto Alegre, 30 de Janeiro de 2009. Seção I, p. 35-40.

SEIXAS, F.R.F.; SEIXAS, J.R.F.; REIS, J.A.; HOFFMAM, F.L. Check-list para diagnóstico inicial das boas práticas de fabricação (BPF) em estabelecimentos produtores de alimentos da cidade de São José do Rio Preto (SP). **Revista Analytica**, n. 33, p. 36-41, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 3ªed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999 p.

SANTOS, M.O.B.; RANGEL, V.P.; AZEREDO, D.P. Adequação de restaurantes comerciais às boas práticas. **Higiene Alimentar**, v. 24, n. 190/191, p. 44-49, 2010.

SÃO JOSÉ, J.F.B.; COELHO, A.I.M.; FERREIRA, K.R. Avaliação das boas práticas em unidades de alimentação e nutrição no município de Contagem-MG. **Alimentação e Nutrição**, v. 22, n. 3, p. 479-487, 2011.

SOARES, L.S.; ALMEIDA, R.C.C.; CERQUEIRA, E.S.; CARVALHO, J.S.; NUNES, I.L. Knowledge, attitudes, and practices in food safety and the presence of coagulase-positive staphylococci on hands of food handlers in the schools of Camaçari, Brasil. **Food Control**, v. 27, n. 1, p. 206-213, 2012.

SOUZA, C.H.; SATHLER, J.; JORGE, M.N.; HORST, R.F.M.L. Avaliação das condições higiênico sanitárias em uma unidade de alimentação e nutrição hoteleira, na cidade de Timóteo-MG. **Nutrir Gerais**, v. 3, n. 4, p. 312-329, 2009.

TAKASHI, S.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; KAWAKAMI, T.; FUKATA, T.; HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 765-769, 2010.

TOMA, C.; LU, Y.; HIGA, N.; NAKASONE, N.; CHINEN, I.; BASCHKIER, A.; RIVAS, M.; IWANAGA, M. Multiplex PRC assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2669-2671, 2003.



## **Relatório do Trabalho de Campo**

A coleta de amostras de alimentos ocorreu conforme o planejado, sendo coletados cinco alimentos de cada hotel. Concordaram em participar da pesquisa 1 hotel da cidade de Pelotas/RS e 3 hotéis da cidade de Rio Grande/RS. O hotel 2 possuía apenas um colaborador no setor de A&B devido a unidade hoteleira ser de porte pequeno e apenas oferecer o serviço de café da manhã. Na análise de equipamentos apenas o hotel 3 não possuía fatiador de frios e por isso não houve a coleta do material.

Para a extração de DNA dos isolados de SCP foi necessário incluir lisostafina para completar a lise celular. Após, foi testado o Multiplex-PCR para identificação das espécies de SCP, porém, o perfil de bandas não foi visualizado, não permitindo a identificação das espécies. Entretanto, os mesmos isolados foram utilizados para análise de rep-PCR permitindo conhecer a similaridade genética dos isolados e as fontes de contaminação dos SCP e coliformes termotolerantes.

**Artigo (segundo normas da revista Cadernos de Saúde Pública)**

**AVALIAÇÃO DAS BOAS PRÁTICAS E IDENTIFICAÇÃO DAS FONTES DE  
CONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS SERVIDOS EM RESTAURANTES  
HOTELEIROS**

Evaluation of Good Practice and Identification of Contamination Sources in  
Served Food of Hotel Restaurants

*Aline de Oliveira Rodrigues<sup>1</sup>; Rita de Cássia dos Santos da Conceição<sup>2</sup>; Eliezer  
Ávila Gandra<sup>3</sup>; Cláudio Dias Timm<sup>4</sup>*

<sup>1</sup> *Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.*

<sup>2</sup> *Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal de pelotas, Pelotas, Brasil.*

<sup>3</sup> *Centro de Ciências Químicas e Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.*

<sup>4</sup> *Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal de pelotas, Pelotas, Brasil.*

**Correspondência**

Rua Gomes Carneiro nº 1, CEP: 96010-610, Pelotas/RS, Faculdade de Nutrição, Campus Anglo, alinerod\_nut@yahoo.com.br

**Resumo**

*Paralelamente ao incremento do turismo, a incidência de doenças de origem alimentar está crescendo em todo mundo. Acredita-se que o consumo de alimentos contaminados seja a principal causa de doenças em turistas. Neste contexto o objetivo deste estudo foi avaliar a aplicação das boas práticas em restaurantes hoteleiros da cidade de Pelotas/RS e Rio Grande/RS e relacioná-las com a qualidade microbiológica dos alimentos oferecidos, além de identificar fontes de contaminação. O setor de alimentos e bebidas (A&B) de quatro hotéis foi avaliado quanto às condições higiênicossanitárias em duas visitas, com intervalo mínimo de 30 dias, através de aplicação de check list fundamentado na norma da RDC 216/2004, e de análises microbiológicas de*

*amostras coletadas no local. Foram realizadas coletas de amostras de superfícies de utensílios, equipamentos e mãos de manipuladores para contagem de Staphylococcus coagulase positiva e de coliformes termotolerantes. Isolados obtidos das culturas dessas contagens foram comparados através de perfis de genéticos obtidos por rep-PCR. Considerando as não conformidades observadas no check list, na primeira visita apenas um hotel foi classificado como ótimo, dois foram classificados como bons e um recebeu a classificação ruim. Entretanto, na segunda visita o hotel classificado como ruim passou para bom, devido à realização de melhorias no restaurante. Alguns resultados das análises microbiológicas apresentaram limite acima do permitido para a contagem dos micro-organismos analisados, identificando falha na aplicação das boas práticas. Através da técnica de rep-PCR, foi identificada uma mesma cepa em amostras de queijo e mãos, manteiga e tábua de corte, queijo e tábua de corte e salada de frutas e mãos, evidenciando contaminação cruzada devido falhas no processo de higiene e manipulação dos alimentos.*

*Segurança dos alimentos; Staphylococcus coagulase positiva; coliformes termotolerantes; rep-PCR.*

## **Abstract**

Parallel to the tourism development, the incidence of foodborne diseases is growing worldwide. It is believed that the consumption of contaminated food is the major cause of disease in tourists. This study goal was to evaluate the application of best practices in hotel restaurants in the cities of Pelotas/RS and Rio Grande/RS and relate it to the microbiological quality of the food offered, besides to identify sources of contamination. The sector of food and beverages (F&B) of four hotels was evaluated in two visits with an interval of 30 days regarding hygiene-sanitary conditions, by application of check list and microbiological analyzes of samples collected on site. Surface, utensils, equipment and hands handlers samples have been collected for counting coagulase positive *Staphylococcus* and thermotolerant coliform. Isolates obtained from these counting cultures were compared by bands profiles obtained by rep-PCR. According to the non-conformity observed in the check list on the first visit, only one hotel was rated as great, two were classified as good and one received a bad rating. However, on the second visit, the one considered bad got a good rate due to improvements in its unit. Some microbiological analysis showed a limit above the allowed for the count of analyzed microorganisms, identifying failure in the hygiene-sanitary process. By rep-PCR, was identified the same strain in samples of cheese and hands, butter and cutting board, cutting board and cheese and fruit salad and hands, showing cross-contamination due to flaws in the process of care and handling of food.

Food security; coagulase positive *Staphylococcus*; thermotolerant coliform; rep-PCR.

## Introdução

O turismo vem se expandindo mundialmente, obtendo crescimento de 5% ao ano, em média, desde 2010, segundo a Organização Mundial do Turismo <sup>1</sup>, proporcionando desenvolvimento e oportunidades econômicas em todo o mundo.

Frente à expansão do turismo, ocorre também o desenvolvimento do mercado hoteleiro que oferece diversos serviços, entre eles o de alimentos e bebidas (A&B), sendo este de fundamental importância devido à necessidade de produzir alimentação balanceada e segura a fim de proporcionar a satisfação e garantir que o cliente não seja exposto a nenhum perigo de origem alimentar <sup>2</sup>. Para o aperfeiçoamento constante das ações de controle sanitário com o objetivo de monitorar e minimizar os riscos de ocorrência de ingestão de alimentos contaminados, é necessária a implementação das Boas Práticas (BP), que são constituídas por normas de procedimentos a fim de atingir um determinado padrão de identidade e qualidade de um produto e/ou serviço na área de alimentos, incluindo-se bebidas, utensílios e materiais que entram em contato com o produto <sup>3</sup>.

As BP são normas obrigatórias pela legislação brasileira para todas as indústrias e estabelecimentos produtores de alimentos e estão pautadas nas Portarias nº 1428/93 <sup>4</sup>, nº 368/97 <sup>5</sup> e nº 78/2009 <sup>6</sup>, e nas Resoluções da Direção Colegiada da ANVISA RDC nº 275/2002 <sup>7</sup> e nº 216/2004 <sup>8</sup>.

Uma importante ferramenta utilizada para a avaliação das BP é a lista de verificação ou *check list*, que pode ser desenvolvida conforme as normas da RDC nº 216/2004 determinada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que permite fazer uma avaliação preliminar das condições higiênicossanitárias de um estabelecimento produtor de alimentos avaliando a presença de não conformidades (NC) <sup>9</sup>.

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são micro-organismos de ampla distribuição, mas são encontrados principalmente na pele e mucosas dos seres humanos e de outros mamíferos <sup>10</sup>. *Staphylococcus aureus* é a espécie mais relacionada a casos e a surtos de intoxicação alimentar, devido à capacidade de produzir enterotoxinas <sup>11</sup>. Além de *S. aureus*, também *S. hyicus* e *S. intermedius* têm sido associados a surtos de intoxicação de origem alimentar, sendo estas três espécies as de maior interesse em microbiologia de alimentos dentro deste gênero <sup>12</sup>. Estes micro-organismos são capazes de produzir coagulase, uma enzima extracelular que coagula o plasma sanguíneo,

característica que é muito utilizada na rotina laboratorial como indicativa destas espécies <sup>13</sup>.

A presença de coliformes termotolerantes em alimentos indica contaminação pós-processamento, geralmente causada por falta de higienização das mãos de manipuladores. A bactéria *Escherichia coli* é o principal coliforme termotolerante encontrado no trato intestinal de humanos e algumas cepas são patogênicas para o homem <sup>14</sup>. *E. coli* enteropatogênicas causam diferentes tipos de infecção e são classificadas em vários patótipos, sendo os principais *E. coli* êntero-hemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) <sup>15</sup>.

Métodos moleculares para diagnóstico de bactérias patogênicas em alimentos estão sendo utilizados como ferramentas mais rápidas e eficazes de diferenciação e identificação de micro-organismos <sup>16</sup>. O desenvolvimento da técnica de amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permite a utilização de sequências específicas do genoma microbiano como marcadores genéticos em nível de gênero, de espécie, e de subespécie, podendo ser utilizada como uma alternativa viável aos métodos morfológicos e bioquímicos tradicionalmente utilizados <sup>17</sup>.

Várias modificações da PCR tem sido descritas, dentre essas, destaca-se a Rep-PCR, que consiste em amplificar regiões entre elementos repetitivos gerando perfis específicos <sup>18</sup>. Essa técnica permite determinar origens de contaminação de micro-organismos patogênicos nos alimentos produzidos em serviços de alimentação como os de hotéis, possibilitando suprir a carência de informações existente nesse ramo de atividade.

O objetivo deste estudo, foi avaliar a aplicação das boas práticas em restaurantes hoteleiros em relação ao controle da qualidade microbiológica dos alimentos manipulados e consumidos nestes estabelecimentos.

## **Metodologia**

### **Restaurantes hoteleiros**

Foram selecionados os setores de A&B de quatro hotéis (identificados como hotel 1, 2 ,3 e 4) localizados na região central das cidades de Rio Grande e Pelotas, Rio Grande do Sul, foi avaliado quanto às condições higiênicossanitárias duas vezes, com intervalo mínimo de 30 dias entre estas, através de aplicação de *check list* (Apêndice A) e de análises microbiológicas de amostras coletadas nesses locais. Para que o estabelecimento participasse do trabalho, o proprietário ou o responsável administrativo pelo estabelecimento, após tomar ciência do projeto, assinou um Termo de Autorização (Apêndice B) para a aplicação de *check list* e coleta de material para análise. Dois colaboradores de cada unidade que trabalhavam

diretamente com a preparação dos alimentos foram convidados a participar da pesquisa e receberam informações sobre o projeto. Após concordarem em participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice C).

O projeto foi submetido à aprovação do comitê de ética da Universidade Federal de Pelotas com o protocolo 24127114.3.0000.5317.

### **Avaliação das boas práticas**

Foi criada uma lista de verificação das boas práticas em forma de questionário tipo *check list* em serviços de alimentação (Apêndice A), conforme procedimentos estabelecidos pela Resolução 216/2004 da ANVISA <sup>8</sup>, que contempla os seguintes itens: identificação da empresa, edificações e instalações (área interna e externa), higienização de equipamentos, móveis e utensílios, controle de pragas, abastecimento de água, manejo de resíduos, manipuladores, matéria-prima, preparação do alimento, transporte de alimentos, exposição ao consumo, registros e responsabilidade. Todos os itens foram avaliados visualmente nas duas visitas, pelo mesmo observador.

A classificação de cada estabelecimento foi baseada em critérios de pontuação estabelecidos pela RDC 275/2002 <sup>7</sup>: ótimo (0 a 25% de NC), bom (25 a 50% de NC) e ruim (>50% de NC).

### **Coleta de amostras**

Em cada estabelecimento, foram coletadas por visita cinco amostras de aproximadamente 200g de alimento, do serviço de café da manhã, dando-se preferência para alimentos de origem láctea, tais como: queijo ricota, queijo mussarela, bebida láctea, doce de leite, nata, manteiga e requeijão, os quais, de uma forma geral, propiciam ambientes favoráveis à multiplicação de bactérias do gênero *Staphylococcus* e de coliformes termotolerantes. As amostras foram coletadas com utensílios estéreis e acondicionadas em sacos plásticos também estéreis.

Para a avaliação da higiene de manipuladores foram coletadas amostras das mãos de dois manipuladores (uma da mão direita e outra da esquerda), utilizando zaragatoas estéreis levemente umedecidas em água peptonada 0,1% estéril, de acordo com as recomendações da American Public Health Association <sup>19</sup>. A zaragatoa foi friccionada em movimentos giratórios da parte inferior da palma direita, até a extremidade dos dedos, repetindo-se esse procedimento três vezes na direção de cada dedo. Já nas bordas, foi passada

a zaragatoa em movimento de vai e vem avançando em um dos lados da mão onde a linha do punho se inicia, passando entre os dedos e, ao final, do outro lado da mão até o punho.

Para avaliação das superfícies e equipamentos foram coletadas amostras de bancadas onde o alimento era manipulado (1 amostra), tábuas de corte (1 amostra) e fatiador de frios (1 amostra), a zaragatoa umedecida em água peptonada 0,1% estéril foi friccionada em uma área de 100cm<sup>2</sup> delimitada através de gabarito de aço inoxidável esterilizado. A área de amostragem das bancadas foi delimitada na região central, assim como para tábuas de corte. Para o cortador de frios a área de amostragem foi a lamina de corte. As zaragatoas foram colocadas em tubos contendo 10mL de água peptonada 0,1% estéril. O total de material coletado foram 12 amostras por estabelecimento. Esse material era acondicionado em caixas isotérmicas com gelo e imediatamente encaminhado ao laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Federal de Pelotas para análise.

### **Quantificação bacteriana**

As amostras foram analisadas através de quantificação de SCP e de coliformes termotolerantes, conforme os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal recomendados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento<sup>13</sup>. Para a contagem de SCP, diluições seriadas de 1mL das amostras foram semeadas em duplicata em ágar Baird-Parker (Himedia, Mumbai, Índia) e incubadas a 37°C por 48h. Cinco colônias típicas e cinco atípicas de cada placa foram inoculadas em Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Himedia) e incubadas a 37°C por 24h para realização da prova da coagulase, que consistiu na mistura de 0,3mL de cada cultura com 0,3mL de plasma de coelho e incubação a 37°C por 6h para observação de coagulação. Foi calculada a proporção de colônias coagulase positivas em relação à contagem de colônias típicas e atípicas na placa e o resultado final da contagem de cada placa foi obtido pela soma do número de colônias coagulase positivas. Após, foi calculada a média das duplicatas e realizada a correção da diluição utilizada para a contagem.

A quantificação de coliformes termotolerantes foi realizada através da técnica do Número Mais Provável (NMP). Um microlitro de cada diluição foi inoculado em séries de três tubos de ensaio com um tubo de Durhan invertido no seu interior contendo caldo Lauril Sulfato de Sódio (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil). Após incubação a 37°C por 48h, foi verificado o crescimento presuntivo de coliformes, indicado pela formação de gás no interior dos tubos de Durhan. Para análise confirmativa de coliformes termotolerantes, foi feita inoculação através da transferência de uma alçada de amostra, a partir dos tubos positivos na etapa anterior, em tubos de ensaio com tubos de Durhan contendo caldo EC

(Acumedia, Michigan, EUA) e incubação a 45°C por 48h. Após, foi observada a produção de gás em cada tubo e o resultado final foi obtido através de tabela específica para NMP.

### Obtenção dos isolados para o rep-PCR

Três colônias de SCP, caracterizadas por produzirem coagulase, obtidas das placas das contagens foram inoculadas em BHI e incubadas a 37°C por 24h. A partir das culturas caracterizadas por coliformes termotolerantes pela produção de gás no caldo EC, uma alçada foi semeada por esgotamento em ágar MacConkey. Após incubação a 37°C por 24h, três colônias lactose positivas e três lactose negativas foram semeadas em BHI e incubadas a 37°C por 24h. As culturas em BHI foram misturadas com 20% de glicerol, para manutenção de estoque a -18°C. Os isolados foram recuperados em BHI a 37°C por 24h, quando necessário.

### Extração de DNA

Resumidamente, o *pellet* obtido por centrifugação de 1mL de cultura em BHI foi ressuspendido em 100µL de tampão STES [Tris-HCl 0,2M, NaCl 0,5M, SDS 0,1% (m/v), EDTA 0,01M, pH 7,6]. Foram adicionados 50µL de pérolas de vidro e 100µL de fenol/clorofórmio. Após homogeneização por 1min, a mistura foi centrifugada a 13.000g por 5min. O sobrenadante foi coletado e precipitado em 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de NaCl 5M a -70°C por 30min. Uma nova centrifugação foi realizada a 13.000g por 20min, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol a 70%. Após foi realizada eluição em 40µL de tampão de eluição (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 7,4)<sup>20</sup>.

Para completar a lise celular dos isolados de SCP, adicionou-se 100µL de solução de lisostafina (100µg/mL de lisostafina em tampão de acetato 20mM) após obtenção do *pellet* obtido pela centrifugação de cultura em BHI e incubou-se a 37°C por 1h. O DNA extraído foi estocado a -18 °C.

### Rep-PCR

Os isolados foram analisados pela rep-PCR, utilizando o *primer* (GTG)<sub>5</sub>'<sup>21</sup>, o qual apresenta elevado poder de discriminação para *Staphylococcus* spp.<sup>21</sup> e coliformes termotolerantes<sup>22</sup>. A técnica foi realizada com modificações. Resumidamente, as condições da rep-PCR foram as seguintes: 2,5 µL de DNA, 2 µL do oligonucleotídeo 5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3', 12,5 µL de Master Mix (Quiagem, Alemanha) e 8 µL de água para completar o volume da reação. Os



ciclos da amplificação foram efetuados da seguinte forma: 1 ciclo de 94°C por 5min, 30 ciclos subsequentes de 95°C por 30seg, 45°C por 1min. e 60°C por 5min., e finalmente 1 ciclo de 60°C por 16min. Para a visualização dos padrões de banda das diferentes regiões amplificadas no genoma, os produtos da PCR foram corados com GelRed e a eletroforese foi realizada em gel de agarose 2%<sup>23</sup>.

Os padrões de bandas do Rep-PCR foram interpretados utilizando a classificação em quatro formas: indistinguíveis (nenhuma banda diferente), intimamente relacionadas (2-3 bandas distintas), possivelmente relacionadas (4-6 bandas distintas) e diferentes (mais de 7 bandas distintas)<sup>24</sup>.

## Resultados e discussão

De acordo com os dados obtidos na avaliação dos itens da lista de verificação, identificando o percentual de inadequação no setor de A&B, na primeira visita aos hotéis avaliados (Tabela 1), o hotel 1 foi classificado como ótimo (18,48% de NC), o hotel 2 como ruim (53,26% de NC) e os hotéis 3 e 4 foram classificados como bons (34,78% e 45,65% de NC, respectivamente), conforme avaliação dos itens de boas práticas. Percebeu-se que os quatro hotéis avaliados possuíam alto percentual de inadequação no item matéria-prima, sendo que as maiores falhas encontradas foram inexistência de área específica para recepção de mercadoria, produtos não eram inspecionados no recebimento e não eram armazenados corretamente, pois muitas mercadorias estavam fora de estrados ou prateleiras e não respeitavam o espaço mínimo entre produtos, piso e parede, que é de 10cm, conforme RDC216/2004. Além disso, quando existiam prateleiras nem todas eram de material liso e impermeável. Problemas semelhantes também foram observados em restaurantes comerciais da cidade de Cascável/PR por Zambiasi<sup>25</sup>, que encontrou falta de controle no recebimento de matéria-prima em 70% de 10 estabelecimentos avaliados, o que é sugestivo de que os setores de A&B dos hotéis apresentam algumas das mesmas deficiências que ocorrem nos restaurantes comerciais.

Tabela 1 - Percentual de inadequação, na primeira visita, do setor de A&B em hotéis de Rio Grande e Pelotas/RS, por blocos avaliados, 2014

Blocos do <i>check list</i>	Total de itens	Não conformidades							
		Hotel 1		Hotel 2		Hotel 3		Hotel 4	
		nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
1. Edificação	31	5	16,13	20	64,52	9	29,03	16	51,61
2. Higienização	8	2	25,00	2	25,00	2	25,00	2	25,00
3. Controle de Pragas	3	0	0,00	3	100,00	0	0,00	0	0,00
4. Abastecimento de água	6	0	0,00	2	33,33	1	16,67	1	16,67
5. Manejo de resíduos	3	0	0,00	0	0,00	1	33,33	1	33,33
6. Manipuladores	11	4	36,36	7	63,64	4	36,36	5	45,45
7. Matéria-prima	5	2	40,00	2	40,00	3	60,00	3	60,00
8. Preparação do alimento	14	3	21,43	7	50,00	7	50,00	8	57,14
10. Exposição ao consumo	7	1	14,29	3	42,86	1	14,29	3	42,86
11. Documentos e registros	3	0	0,00	3	100,00	3	100,00	3	100,00
12. Responsabilidade	1	0	0,00	1	100,00	1	100,00	0	0,00
Total	92	17	18,48	49	53,26	32	34,78	42	45,65

O bloco 9 refere-se ao transporte dos alimentos preparados, este não se aplica à realidade dos hotéis, por isso foi retirado da tabela. nº - número de não conformidades  
Ótimo: 0 a 25% de NC, Bom: 25 a 50%, Ruim: >50%.

O item edificações apresentou alto índice de inadequação no hotel 2 e 4 (64,52% e 51,61% de NC, respectivamente), pois apresentou fluxo não ordenado e com cruzamentos no preparo dos alimentos, instalações físicas em mau estado de conservação, pisos com ralos não sifonados, luminárias e instalações elétricas não protegidas, pouca ventilação e os sanitários não possuíam sabonete antisséptico. Todos esses fatores não são permitidos pela legislação sanitária vigente, por isso, segundo Silva Jr. <sup>26</sup>, a fase de planejamento físico de um restaurante deve ser realizada por uma equipe multiprofissional com a presença de um profissional que entenda de administração de serviço de alimentação, sempre levando em consideração a organização, os fluxos e as técnicas a serem desenvolvidas na unidade de alimentação.

Apenas o hotel 2 apresentou irregularidade no controle integrado de pragas (100% de NC), pois não tinha nenhuma ação eficaz e contínua para manter a unidade livre de vetores e pragas. Tal fato foi observado também por Ferraz <sup>27</sup>, que avaliou 15 restaurantes comerciais da cidade de São Paulo e verificou que 10 não possuíam registro de controle de pragas. Este hotel também possuiu alto valor de inadequação para manipuladores (63,64%), pois foi constatado que não havia correta frequência e higienização das mãos, os manipuladores não estavam com unhas curtas e usavam adornos, assim como não havia registro de capacitação periódica de higiene e manipulação de alimentos para estes profissionais. Altos percentuais de inadequação para manipuladores também foram encontrados por Serafim <sup>28</sup>, que avaliou as boas práticas de 12 hotéis da cidade de Porto Alegre/RS, através de *check list*, e

constatou que 10 estabelecimentos ficaram classificados com nível insatisfatório para este item. Cabe ressaltar que dentre os fatores que contribuem para ocorrência de doenças causadas por patógenos veiculados por alimentos, a falha no processo de higienização das mãos é de grande importância.

Da mesma forma, para assegurar a qualidade da alimentação, é necessário que todas as etapas de preparação do alimento estejam de acordo com a legislação, fato que não foi observado nos hotéis 2, 3 e 4 que obtiveram elevado percentual de inadequação. As principais falhas encontradas foram risco de contaminação cruzada, não verificação de temperatura dos alimentos, produtos preparados e não devidamente etiquetados e processo inadequado na higienização de hortifrutigranjeiros. Tal fato, também foi verificado por Serafim<sup>28</sup>, que após avaliação dos procedimentos de higienização de hortifrutigranjeiros de restaurantes de hotéis constatou que 100% dos estabelecimentos estavam inadequados, sendo que 42% dos hotéis nem sequer tinham produto específico para desinfecção desses alimentos, observação que também foi feita no hotel 2 do nosso estudo.

Quanto aos itens documentos e registros e responsabilidade, apenas o hotel 1 apresentou o manual de boas práticas e os POPs estabelecidos. Entretanto, algumas etapas do manual não estavam sendo cumpridas. Os hotéis 1 e 4 tinham a presença de um responsável técnico pelas atividades de manipulação dos alimentos, conforme exigido pela RDC 216<sup>8</sup>. Os hotéis 2 e 3 não tinham responsável capacitado. Tal fato evidencia a inobservância por parte do responsável pelos estabelecimentos e pelo órgão competente fiscalizador em fazer cumprir o estabelecido pela legislação.

Na segunda visita aos estabelecimentos foram observadas algumas modificações nos procedimentos de boas práticas, conforme apresentado na Tabela 2. Os hotéis 1, 3 e 4 continuaram com a mesma classificação de acordo com o número de NC encontradas, porém o hotel 2 passou de ruim para bom (46,74% de NC). Esse estabelecimento havia recebido uma notificação por parte do órgão fiscalizador do município, anterior a nossa primeira visita, para que fossem realizadas algumas regularizações, tais como, instalação de telas milimétricas em portas e janelas, coletores de resíduos dotados de tampa e com acionamento não manual e troca dos utensílios com cabo de madeira para utensílios com cabo de polietileno. Todas essas alterações foram realizadas e observadas na segunda verificação das boas práticas melhorando a classificação do estabelecimento. Apesar de todas essas melhorias no estabelecimento o item manipuladores no hotel 2 manteve o alto percentual de inadequação (63,64%), o que evidenciou a falta de supervisão e treinamento e a ausência de um responsável capacitado para as atividades de manipulação de alimentos. Esse fato também foi evidenciado por Carrijo<sup>29</sup>, que ressaltaram a importância de treinamento constante e monitoramento diário das práticas corretas de manipulação de alimentos a fim de evitar muitos erros cometidos por desinformação e/ou falta de fiscalização.

Tabela 2 - Percentual de inadequação, da segunda visita, do setor de A&B em hotéis de Rio Grande e Pelotas/RS, por blocos avaliados, 2014

Blocos do <i>check list</i>	Total de itens	Não conformidades							
		Hotel 1		Hotel 2		Hotel 3		Hotel 4	
		n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
1. Edificação	31	4	12,90	15	48,39	9	29,03	6	19,35
2. Higienização	8	2	25,00	1	12,50	1	12,50	2	25,00
3. Controle de Pragas	3	0	0,00	1	33,33	0	0,00	0	0,00
4. Abastecimento de água	6	0	0,00	1	16,67	1	16,67	1	16,67
5. Manejo de resíduos	3	0	0,00	0	0,00	1	33,33	0	0,00
6. Manipuladores	11	1	9,09	7	63,64	4	36,36	5	45,45
7. Matéria-prima	5	2	40,00	3	60,00	2	40,00	2	40,00
8. Preparação do alimento	14	3	21,43	8	57,14	5	35,71	8	57,14
10. Exposição ao consumo	7	1	14,29	3	42,86	1	14,29	2	28,57
11. Documentos e registros	3	0	0,00	3	100,00	3	100,00	3	100,00
12. Responsabilidade	1	0	0,00	1	100,00	1	100,00	0	0,00
Total	92	13	14,13	43	46,74	28	30,43	29	31,52

O bloco 9 refere-se ao transporte dos alimentos preparados, este não se aplica à realidade dos hotéis, por isso foi retirado da tabela. n° - número de não conformidades

Ótimo: 0 a 25% de NC, Bom: 25 a 50%, Ruim: >50%.

No hotel 4, também houve algumas modificações principalmente no item edificações, já que este estabelecimento estava passando por reformas no setor de A&B durante a primeira visita, sendo assim, percebeu-se adequações no fluxo de todas as etapas de preparo dos alimentos evitando cruzamentos e facilitando as operações de limpeza e desinfecção. Apesar das melhorias o item preparação do alimento continuou com alto valor de inadequação para este hotel (57,14%), assim como para o hotel 2 que apresentou o mesmo percentual de inadequação. Os principais itens incorretos encontrados nesse bloco continuaram sendo falhas na identificação do produto, não verificação da temperatura dos alimentos produzidos, incorreta higienização de hortifrutigranjeiros, além da exposição dos produtos perecíveis à temperatura ambiente por tempo superior ao necessário para preparação. Conforme recomendação da RDC 216<sup>8</sup>, todas as matérias-primas e ingredientes que não forem utilizados em sua totalidade devem ser acondicionados e identificados com, no mínimo, as seguintes informações: designação do produto, data de fracionamento e de validade após a abertura ou retirada da embalagem original. A legislação recomenda também que a eficácia do tratamento térmico deve ser avaliada pela verificação da temperatura e do tempo utilizado e, quando aplicável, pelas mudanças na textura e cor na parte central do alimento, além disso, os alimentos a serem consumidos crus devem ser

submetidos à higienização com a utilização de produtos regularizados no órgão competente do Ministério da Saúde e devem ser aplicados de forma a evitar a presença de resíduos no alimento.

Diante do exposto, torna-se imprescindível a conscientização dos responsáveis deste setor, em relação às boas práticas de manipulação proporcionando treinamentos contínuos aos manipuladores de alimentos e maiores investimentos na melhoria da estrutura física, garantindo assim um produto em acordo com os padrões aceitáveis de higiene e sanidade.

### **Análises microbiológicas**

Os alimentos coletados estavam expostos para consumo no serviço de *buffet* do café da manhã nos estabelecimentos analisados. Conforme resultados apresentados na Tabela 3, na primeira coleta de amostras, o hotel 1 apresentou contagem de SCP acima do limite microbiológico permitido pela legislação brasileira para queijo prato <sup>30</sup>, doce de leite e salada de frutas, apresentando  $1,9 \times 10^6$  UFC/g no queijo prato, tornando-se um risco de intoxicação alimentar para o consumidor, já que SCP pode produzir enterotoxina termorresistente quando sua população ultrapassa  $10^5$  UFC/g de alimento <sup>31</sup>. Nesse hotel, também se verificou, para estes mesmos alimentos e para queijo ricota, contagem de coliformes termotolerantes  $>1,1 \times 10^3$  NMP/g. Estes resultados demonstram que o hotel 1 apesar de ser classificado como ótimo, após a verificação das boas práticas, não ofereceu o produto em condições higiênicossanitárias adequadas para o consumidor, evidenciando falhas no processo de fiscalização e monitoramento das etapas de produção.

Tabela 3 – Resultados das análises microbiológicas de *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes dos alimentos analisados nos hotéis de Rio Grande e Pelotas/RS, 2014.

Amostra	Hotel 1		Hotel 2		Hotel 3		Hotel 4		Limites microbiológicos*									
	Coleta 1		Coleta 2		Coleta 1		Coleta 2		SCP	CT								
	SCP	CT	SCP	CT	SCP	CT	SCP	CT	(UFC/g ou mL)	(NMP/g ou mL)								
Ricota	A	I	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0x10 <sup>3</sup>	5,0x10 <sup>3</sup>
Queijo prato	I	I	A	A	I	A	A	A	A	A	I	A	A	A	A	A	1,0x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>
Bebida láctea	A	A	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	A	A	5x10 <sup>2</sup>	1,0x10 <sup>1</sup>
Doce de leite	I	I	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0x10 <sup>2</sup>	5,0x10 <sup>1</sup>
Salada de frutas	I	I	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0x10 <sup>3</sup>	5,0x10 <sup>2</sup>
Mel	-	-	-	-	A	A	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0x10 <sup>2</sup>
Presunto	-	-	-	-	I	A	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	5,0x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>5</sup>
Manteiga	-	-	-	-	A	A	A	A	A	A	I	A	-	-	-	-	1,0x10 <sup>2</sup>	1,0x10 <sup>1</sup>
Queijo colonial	-	-	-	-	-	-	-	-	I	I	I	A	-	-	-	-	1,0x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>
Nata	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	A	A	-	-	-	-	1,0x10 <sup>2</sup>	1,0x10 <sup>1</sup>
Leite quente	-	-	-	-	I	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Aus.	Aus.
Batida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	A	A	5x10 <sup>2</sup>	1,0x10 <sup>1</sup>
Requeijão	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	A	A	1,0x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>1</sup>

\*Limites microbiológicos estabelecidos por BRASIL (2001). SPC - *Staphylococcus* coagulase positivo; CT- coliformes termotolerantes; A – limite microbiológico aceitável; I – limite microbiológico inaceitável; UFC - unidade formadora de colônia; NMP - número mais provável; Aus. – ausência.

Nas amostras de alimentos analisados no hotel 2, não ocorreu crescimento de coliformes termotolerantes, entretanto a contagem de SCP foi elevada para queijo prato, presunto e leite quente. A contaminação encontrada no leite quente sugere que ocorreram falhas no processo de higienização do utensílio utilizado para armazenamento do produto durante a distribuição, visto que *Staphylococcus* é eliminado no tratamento térmico do leite.

As contagens de coliformes termotolerantes e SCP estavam acima do limite microbiológico permitido para o queijo colonial analisado no hotel 3, tornando-se um risco de DTA aos consumidores. A presença de coliformes termotolerantes sugere o uso de matérias-primas de baixa qualidade, condições inadequadas de processamento, falha na higiene de manipuladores ou ainda armazenamento e transporte inadequados, conforme descrito por Ferreira <sup>32</sup>, que analisou 20 amostras de queijo minas frescal obtidas de feiras livres da cidade de Uberlândia-MG e constatou que 80% das amostras estavam acima do limite aceitável pela legislação para contagem de coliformes termotolerantes.

Na segunda coleta realizada nos hotéis, apenas o hotel 3 apresentou contagens elevadas para SCP para queijo colonial, queijo prato e manteiga com valores de  $4,0 \times 10^5$ ,  $8,0 \times 10^5$  e  $2,7 \times 10^2$  UFC/g, respectivamente, conforme apresentado na Tabela 3. Esse estabelecimento manteve sua classificação como boa na verificação das boas práticas, porém, identificou-se um número maior de alimentos inadequados nessa coleta, o que pode ser explicado por ter havido a substituição de 100% da equipe do setor de A&B. Segundo Serafim <sup>28</sup>, a grande maioria dos restaurantes de hotéis apenas promove capacitação dos manipuladores após o período de experiência, devido a constante troca de funcionários nesse setor, o que pode comprometer a correta higiene de manipuladores e de outros processos de manipulação pela falta de informação da nova equipe.

As análises das mãos dos manipuladores demonstraram que em todos os hotéis pelo menos uma das mãos apresentou contagem acima do recomendado pela American Public Health Association <sup>19</sup>, conforme mostrado na Tabela 4. Foram encontradas contagens de até  $2,1 \times 10^6$  UFC/mão de SCP, indicando incorreta aplicação ou ausência de higienização das mãos, o que pode acarretar contaminação dos alimentos. Resultado semelhante foi encontrado por Coelho <sup>33</sup>, que encontrou amostras com valores de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mão após avaliar os manipuladores de restaurantes comerciais da cidade de Viçosa (MG).

Tabela 4 – Resultados das análises microbiológicas de *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes das mãos de manipuladores, equipamentos e utensílios analisados nos hotéis de Rio Grande e Pelotas/RS, 2014

Amostra	Hotel 1		Hotel 2		Hotel 3		Hotel 4		Limites microbiológicos									
	Coleta 1		Coleta 2		Coleta 1		Coleta 2											
	SCP	CT	SCP	CT	SCP	CT	SCP	CT	SCP	CT	SCP UFC mão/cm <sup>2</sup>	CT NMP mão/cm <sup>2</sup>						
MD1	I	I	A	A	A	A	A	A	A	I	I	A	A	A	A	I	1,0x10 <sup>2</sup>	Aus.
ME1	I	I	A	A	I	A	A	A	I	I	A	A	A	A	A	A	1,0x10 <sup>2</sup>	Aus.
MD2	I	A	A	A	-	-	A	A	A	I	I	A	A	I	A	I	1,0x10 <sup>2</sup>	Aus.
ME2	A	A	A	A	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	1,0x10 <sup>2</sup>	Aus.
Bancada	I	A	A	A	A	A	A	A	A	A	I	A	A	I	A	A	2,0x10 <sup>1</sup>	2,0x10 <sup>1</sup>
Tábua de corte	I	A	A	A	A	A	A	A	A	A	I	A	A	I	A	A	1,0x10 <sup>2</sup>	1,0x10 <sup>2</sup>
Fatiador de frios	I	A	A	A	A	A	A	A	-	-	-	-	A	A	A	A	2,0x10 <sup>1</sup>	2,0x10 <sup>1</sup>

\*Limites microbiológicos estabelecidos por APHA (2001) e FDA (2004). SPC - *Staphylococcus* coagulase positivo; CT- coliformes termotolerantes; A – limite microbiológico aceitável; I – limite microbiológico inaceitável; UFC - unidade formadora de colônia; NMP - número mais provável; MD1 – mão direita manipulador 1; ME1 – mão esquerda manipulador 1; MD2 – mão direita manipulador 2; ME2 – mão esquerda manipulador 2; Aus. – ausência.



A bancada, tábua de corte e fatiador de frios pertencentes ao hotel 1 apresentaram resultados elevados para a análise de SCP. A bancada e tábua de corte avaliada no hotel 4 demonstraram contagens acima do permitido para coliformes termotolerantes, apresentando valores de  $2,8 \times 10^2$  NMP/cm<sup>2</sup> para bancada e  $2,1 \times 10^2$  NMP/cm<sup>2</sup> para tábua de corte. Tais resultados podem evidenciar a ineficiência dos processos de limpeza e desinfecção dos utensílios e equipamentos que entram em contato direto com os alimentos, podendo ocasionar contaminação cruzada. Resultados semelhantes foram encontrados por Kochanski<sup>34</sup>, que coletaram amostras de equipamentos e utensílios de uma unidade de alimentação e nutrição no Alto Uruguai/RS e constataram que todas as amostras de bancada, processador manual e tábua de corte, considerados higienizados pelos manipuladores, não se encontravam dentro dos limites aceitáveis para micro-organismos aeróbicos mesófilos, provavelmente pela inexistência de um procedimento operacional padronizado (POP), considerando que estes micro-organismos podem ser removidos pelos processos convencionais de limpeza e sanitização.

A análise de mãos de manipuladores permaneceu com valores acima do limite permitido para os hotéis 3 e 4 na segunda coleta, porém, os hotéis 1 e 2 não apresentaram inadequação para essa análise. Esse fato pode evidenciar a melhora no controle e monitoramento da aplicação das boas práticas de manipulação, conforme relatado pelo responsável técnico do hotel 1 que informou ter intensificado o controle da correta higienização das mãos dos manipuladores, através do uso de agente bactericida apropriado.

Da mesma forma, somente o hotel 3 apresentou contagens elevadas para os utensílios e equipamentos avaliados na segunda visita, atingindo valores de  $2,2 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup> para bancada e  $8,7 \times 10^1$  UFC/cm<sup>2</sup> para tábua de corte na análise de SCP. Esses resultados evidenciam a necessidade da capacitação e a adoção de procedimento operacional padronizado para os processos de higiene, a fim de assegurar o controle sanitário dos alimentos.

### **Fontes de contaminação**

Analisou-se a similaridade genética dos isolados de SCP e CT através dos produtos de subtipagem obtidos pela técnica de rep-PCR. O perfil de bandas dos isolados de SCP pertencentes à primeira coleta do hotel 1, referente ao queijo prato e à tábua de corte, eram indistinguíveis entre si, o que supõe contaminação cruzada entre esses elementos. Também foram classificados como indistinguíveis os perfis de bandas obtidos dos isolados de SCP do queijo colonial e mão direita dos dois manipuladores avaliados na segunda coleta do hotel 3, o que demonstra falha nos processos de higiene dos manipuladores durante a manipulação de alimentos. A tábua de corte e a

manteiga analisada neste mesmo estabelecimento também apresentaram perfil de bandas indistinguíveis, evidenciando a incorreta limpeza e desinfecção deste utensílio que possui contato direto com os alimentos e pode constituir importante fonte de veiculação de micro-organismos patogênicos. Conforme ressaltado por Aguiar<sup>35</sup>, deve ser realizada substituição periódica das tábuas de corte regularmente, pois os excessivos cortes podem armazenar micro-organismos que se aderem na superfície de contato, comprometendo a higiene desses materiais. No nosso estudo, todas as tábuas de corte analisadas eram de material de polietileno, apenas o hotel 2 possuía tábua de vidro e esta estava livre de contaminação.

Na análise de similaridade genética dos isolados de CT, apenas encontrou-se perfil de bandas indistinguíveis para os produtos de salada de frutas e mão de manipulador da coleta 1 do hotel 1, que identifica o manipulador como agente potencial de contaminação, confirmando a necessidade de adoção de práticas corretas de higiene durante o processamento de alimentos. Tal fato também foi comprovado por Chavapal<sup>36</sup> que aplicou a técnica de rep-PCR para avaliar a higiene de ordenha em fazendas leiteiras para o monitoramento da qualidade do leite, este autor rastreou *staphylococcus aureus* em diferentes pontos da linha de produção e encontrou nas mãos dos ordenhadores a principal fonte de contaminação, através da similaridade genética do perfil de bandas.

Dessa forma, conclui-se que os restaurantes hoteleiros apresentaram inadequação ou ineficiência no processo higiênicossanitário de parte dos itens avaliados, comprometendo parcialmente a qualidade microbiológica dos alimentos oferecidos ao consumidor.

Este estudo também demonstrou a importância dos manipuladores como causas potenciais de contaminação de alimentos e a necessidade de capacitação constante e monitoramento das atividades de produção para minimizar possíveis falhas e garantir a qualidade no serviço. Além disso, fica evidenciado que as falhas no processo de limpeza e desinfecção de utensílios representam um importante fator para a manutenção das fontes de contaminação dos alimentos, as quais poderiam ser eliminadas com a adoção de medidas de higiene padronizadas, de forma a oferecer condições seguras durante a manipulação.

## Referências

1. OTM, 2014. Organização Mundial do Turismo. Disponível em: <<<http://media.unwto.org/press-release/2014-09-15/international-tourism-5-first-half-year>>>. Acesso em: 25 out. 2014.
2. SOUZA, C.H.; SATHLER, J.; JORGE, M.N.; HORST, R.F.M.L. Avaliação das condições higiênico sanitárias em uma unidade de alimentação e nutrição hoteleira, na cidade de Timóteo-MG. **Nutrir Gerais**, v. 3, n. 4, p. 312-329, 2009.
3. AKUTSU, R. C.; *et.al.* Adequação das boas práticas de fabricação em serviços de alimentação. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 419-427, 2005.
4. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n.º 1428 de 26 de novembro de 1993. Dispõe sobre o controle de qualidade na área de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2 dez. 1993, Seção I, p. 18415-18419.
5. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n.º 368 de 04 de setembro de 1997. Dispõe sobre regulamento técnico das condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 8 set. 1997. Seção I, p. 19697.
6. RS (2009). Secretaria da saúde do estado do Rio Grande do Sul. Portaria n.º 78 de 30 de janeiro de 2009. Dispõe sobre a lista de verificação em boas práticas para serviços de alimentação, aprova normas para cursos de capacitação em boas práticas para serviços de alimentação e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Porto Alegre, 30 de Janeiro de 2009. Seção I, p. 35-40.
7. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos e a lista de verificação de boas práticas de fabricação em estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 06 nov. 2002. Seção I, p. 4-21.
8. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º 216 de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre regulamento técnico de boas práticas para serviço de alimentação. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 set. 2004. Seção I, p. 25.
9. SEIXAS, F.R.F.; SEIXAS, J.R.F.; REIS, J.A.; HOFFMAM, F.L. Check-list para diagnóstico inicial das boas práticas de fabricação (BPF) em estabelecimentos produtores de alimentos da cidade de São José do Rio Preto (SP). **Revista Analytica**, n. 33, p. 36-41, 2008.

10. NEVES, M.C.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; ALVES, E.C.C.; LEMOS, M.V.F. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus* spp. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**. v. 74, n. 3, p.207 –213, 2007.
11. SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**, São Paulo: Livraria Varela, 2001. 317p.
12. FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Micro-organismos patogênicos de importância em alimentos. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 33-81, 2003.
13. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26/08/2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 set. 2003. Seção I, p. 14-51.
14. CAMPOS, A.K.C.; CARDONHA, A.M.S.; PINHEIRO, L.B.G.; FERREIRA, N.R.; AZEVEDO, P.R.M.; STAMFORD, T.L.M. Assessment of personal hygiene and practices of food handlers in municipal public schools of Natal, Brazil. **Food control**, n. 20, p. 807-810, 2009.
15. MURRAY, P.R. Enterobacteriaceae. In: MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
16. MALORNY, B., TASSIOS, P. T., RADSTRÖM, P., COOK, N., WAGNER, M., HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, 2002.
17. FARBER, J. M., GENDEL, S. M., TYLER, K. D., BOERLIN, P., LANDRY, W. L., FRITSCHER, S. J., BARRETT, T. J. Molecular typing and differentiation. In: DOWNES, F. P., ITO, H. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chap. 11, p.127-158.
18. GANDRA, E. A.; GANDRA, T. K. V.; MELLO, W. S. GODOI, H. S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Maringá**, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.
19. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION [APHA]. Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: APHA, 2001. 676 p.

20. SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning**: A laboratory manual. 3<sup>o</sup>ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999 p.
21. BRAEM, G.; DE VLIEGHER, S.; SUPRÉ, K.; HAESEBROUCK, F.; LEROY, F.; DE VUYST, L. (GTG)<sub>5</sub>-PCR fingerprinting for the classification and identification of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine milk and teat apices: A comparison of type strains and field isolates. **Veterinary Microbiology**, n. 147, p. 67-74, 2011.
22. MOHAPATRA, B.R.; BROERSMA, K.; MAZUMDER, A. Comparison of the five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. **FEMS Microbiology Letters**, v. 277, p. 98-106, 2007.
23. VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria with repetitive sequencebased polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25–40, 1994.
24. TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWANMINATHAN, B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, sept. 1995
25. ZAMBIAZI, S.; MARTINS, A. H. Condições de armazenamento em restaurantes comerciais na cidade de Cascável, PR. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 24, n. 180/181, p. 36-42, jan/fev 2010.
26. SILVA Jr., E. A. da. Manual de controle higiênico sanitário em serviços de alimentação. 6 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2008.
27. FERRAZ, A. P. da C. Condições higiênico sanitárias de *buffets* da região do ABC, SP. **Higiene alimentar**, São Paulo, v. 24, n. 184/185, p. 53-59, maio/jun, 2010.
28. SERAFIM, A. L. **Avaliação dos procedimentos de boas práticas na área de alimentos e bebidas em hotéis**. 2010. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
29. CARRIJO, K. de F. *et al.* Avaliação das boas práticas e condições higiênicosanitárias na elaboração de alimentos em um restaurante universitário do Rio de Janeiro, RJ. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 24, n. 184/185, p. 38-41, maio/jun. 2010.
30. BRASIL. Resolução-RDC n° 12, de 02 de Janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasil, n° 7-E, p. 46-53, 10 Jan. 2001, seção I.

31. JAY, J. M. Staphylococcal Gastroenteritis. **Modern Food Microbiology**, 6<sup>a</sup> Ed. Gaithersburg-Maryland: Aspen Publishers, p. 429-450, Inc. 635p. 2000.
32. FERREIRA, R. M.; SPINI, J. C. M.; CARRAZZA, I. G.; SANT'ANA, D. S.; OLIVEIRA, M. T.; ALVES, L. R.; CARRAZZA, T. G. Quantificação de coliformes totais e termotolerantes em queijo minas Frescal Artesanal. **Pubvet**, v. 5, Ed. 152, Art. 1022, 2011.
33. COELHO, A. I. M.; MILAGRES, R. C. R. M.; MARTINS, J. F. L.; AZEREDO, R. M. C.; SANTANA, A. M. C. Contaminação microbiológica de ambientes e superfícies em restaurantes comerciais. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, pg. 1597-1606, 2010.
34. KOCHANSKI, S.; PIEROZAN, M.K; MOSSI, A.J.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R.L.; GHISLENI, C.P.; TONIAZZO, G. Avaliação das condições microbiológicas de uma unidade de alimentação e nutrição. **Alimentação e Nutrição**, v. 20, n. 4, p. 663-668, 2009.
35. AGUIAR, C; et al. Implementação de boas práticas de manipulação em uma creche do município de São Paulo. **Cadernos**. Centro Universitário S. Camilo, São Paulo, v.12, n.1, p.47-57, jan./mar. 2006.
36. CHAVAPAL, L.; MOON, D. H.; GOMES, J. E.; DUARTE, F. R.; TSAI, S. M. Aplicação da técnica de Rep-PCR no rastreamento de *Staphylococcus aureus* em salas de ordenha, para o monitoramento da qualidade do leite. **Braz. J. Vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v. 43, n.3, p. 309-320, 2006.

## Apêndices

**Apêndice A - LISTA DE VERIFICAÇÃO DAS BOAS PRÁTICAS DE  
MANIPULAÇÃO EM SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO**

DATA:

**A - IDENTIFICAÇÃO DA EMPRESA**

RAZÃO SOCIAL:

NOME DE FANTASIA:

ALVARÁ/LICENÇA SANITÁRIA:

INSCRIÇÃO ESTADUAL / MUNICIPAL:

CNPJ / CPF: FONE:

E - mail:

ENDEREÇO: Nº: Compl.:

BAIRRO: MUNICÍPIO: UF: CEP:

RAMO DE ATIVIDADE: PRODUÇÃO MENSAL:

NÚMERO DE FUNCIONÁRIOS:

NÚMERO DE TURNOS:

RESPONSÁVEL LEGAL/PROPRIETÁRIO DO ESTABELECIMENTO:

<b>Edificações, instalações, equipamentos, móveis e utensílios</b>	<b>C</b>	<b>NC</b>	<b>NA</b>
As edificações e instalações são projetadas de forma a possibilitar o fluxo ordenado e sem cruzamentos em todas as etapas de preparação dos alimentos e a facilitar as operações de manutenção, limpeza e desinfecção.			
O acesso as instalações é controlado e independente, não comum a outros usos.			
O dimensionamento das edificações e instalações é compatível com todas as operações.			
Existe separação entre as diferentes atividades por meios físicos ou por outros meios eficazes de forma a evitar a contaminação cruzada.			
As instalações físicas como piso, parede e teto possuem revestimento liso, impermeável e lavável.			
As instalações físicas são mantidas integras, conservadas, livres de rachaduras, trincas, goteiras, vazamentos, infiltrações, bolores, descascamentos, dentre outros.			
As portas e janelas são ajustadas aos batentes.			
As portas da área de preparação e armazenamento de alimentos são dotadas de fechamento automático.			
As aberturas externas das áreas de armazenamento e preparação de alimentos, inclusive o sistema de exaustão, são providas de telas milimetradas para			



impedir o acesso de vetores e pragas urbanas.			
As instalações são abastecidas de água corrente e dispõe de conexões com rede de esgoto ou fossa séptica.			
Os ralos são sifonados e as grelhas possuem dispositivo de fechamento.			
As caixas de gordura e esgoto possuem dimensão compatível ao volume de resíduos, estão localizadas fora da área de preparação e armazenamento de alimentos e apresentam adequado estado de conservação e funcionamento.			
As áreas internas e externas estão livres de objetos em desuso ou estranhos ao ambiente e não há presença de animais.			
A iluminação da área de preparação proporciona correta visualização de forma a não comprometer as atividades de higiene e as características sensoriais dos alimentos.			
As luminárias são apropriadas e estão protegidas contra explosão e quedas acidentais.			
As instalações elétricas estão protegidas ou embutidas em tubulações externas e íntegras de forma a permitir a higienização dos ambientes.			
A ventilação garante a renovação do ar e manutenção do ambiente livre de fungos, gases, fumaça, pós, partículas em suspensão, condensação de vapores dentre outros que possam comprometer a qualidade higiênico-sanitária do alimento.			
O fluxo de ar não incide diretamente sobre os alimentos			
Os equipamentos e filtros para climatização estão conservados.			
A limpeza do sistema de climatização, a troca de filtros e a manutenção programada e periódica desses equipamentos são registradas e realizadas conforme legislação específica.			
As instalações sanitárias e vestiários não se comunicam diretamente com a área de preparação e armazenamento de alimentos ou refeitórios.			
Os sanitários e vestiários são mantidos organizados e em adequado estado de conservação.			
As portas externas dos sanitários e vestiários são dotadas de fechamento automático.			
As instalações sanitárias possuem lavatórios e estão supridas de produtos destinados à higiene pessoal tais como papel higiênico, sabonete líquido inodoro anti-séptico ou sabonete líquido inodoro e produto anti-séptico e toalhas de papel não reciclado ou outro sistema higiênico e seguro para secagem das mãos.			
Os sanitários possuem coletores de resíduos dotados de tampa e acionamento não manual.			
Existe lavatório exclusivo para higienização das mãos na área de manipulação, em local estratégico em relação ao fluxo de preparo dos alimentos e em número suficiente.			
O lavatório possui sabonete líquido inodoro anti-			

séptico ou sabonete líquido inodoro e produto anti-séptico, toalhas de papel não reciclável ou outro sistema higiênico e seguro de secagem das mãos e coletor de papel acionado sem contato manual.			
Os equipamentos, móveis e utensílios que entram em contato com alimentos são de materiais que não transmitem substâncias tóxicas, odores, nem sabores aos mesmos.			
Os equipamentos, móveis e utensílios são mantidos em adequado estado de conservação e são resistentes a corrosão e a repetidas operações de higiene.			
São realizadas manutenção programada e periódica dos equipamentos e utensílios e calibração dos instrumentos ou equipamentos de medição, mantendo registro dessas operações.			
As superfícies dos equipamentos, móveis e utensílios utilizados na preparação, embalagem, armazenamento, transporte, distribuição e exposição à venda dos alimentos são lisas, laváveis e estão isentas de rugosidades, frestas e outras imperfeições.			
<b>Higienização de instalações, equipamentos, móveis e utensílios</b>			
As instalações, equipamentos, móveis e utensílios são mantidos em condições higiênico-sanitárias adequadas.			
As caixas de gorduras são periodicamente limpas.			
As operações de higiene das instalações e equipamentos são registradas em formulário específico.			
A higienização da área de preparo do alimento é feita conforme a necessidade e imediatamente após o término do trabalho.			
Os produtos saneantes utilizados são registrados pelo Ministério da Saúde. A diluição, tempo de contato e modo de uso/aplicação obedecem as instruções do fabricante.			
Os produtos saneantes são guardados em local reservado para esta finalidade.			
Os utensílios e equipamentos utilizados na higienização são próprios para atividade e são conservados limpos, em número suficiente e guardados em local específico.			
Os funcionários responsáveis pela atividade de higienização das instalações sanitárias utilizam uniformes apropriados e diferenciados daqueles utilizados na manipulação dos alimentos.			
<b>Controle integrado de vetores e pragas urbanas</b>			
A edificação, instalações, equipamentos, móveis e utensílios estão livres de vetores e pragas .			
Existe ações eficazes e contínuas de controle de vetores e pragas urbanas.			
O controle químico é empregado e executado por empresa especializada com produtos desinfestantes regularizados pelo Ministério da Saúde.			
<b>Abastecimento de água</b>			

Somente é utilizado água potável para manipulação dos alimentos.			
Se utilizado solução alternativa para abastecimento de água, a potabilidade é atestada semestralmente mediante laudos laboratoriais.			
O gelo utilizado para alimentos é fabricado a partir de água potável, mantido em condição higiênico-sanitária adequada.			
O vapor, quando em contato direto com alimentos ou superfícies que entrem em contato com alimentos são produzidos a partir de água potável.			
O reservatório de água é livre de vazamentos, rachaduras, vazamentos, infiltrações, descascamentos, dentre outros defeitos e em adequado estado de conservação, devendo estar devidamente tampado.			
O reservatório de água é higienizado em um intervalo máximo de 6 meses devendo ser mantido registros da operação.			
<b>Manejo de resíduos</b>			
Os recipientes são identificados e íntegros, de fácil higienização e transporte, em número e capacidade suficientes para conter os resíduos.			
Os coletores utilizados na área de preparação e armazenamento de alimentos são dotados de tampas acionadas sem contato manual.			
Os resíduos são frequentemente coletados e estocados em local fechado e isolado da área de preparação dos alimentos, de forma a evitar focos de contaminação.			
<b>Manipuladores</b>			
O controle de saúde é registrado e realizado de acordo com legislação específica.			
Os manipuladores que apresentam lesões e ou sintomas de enfermidades são afastados da atividade de preparação dos alimentos enquanto persistirem essas condições de saúde.			
Os manipuladores tem asseio pessoal, apresentando-se com uniformes conservados e limpos.			
Os manipuladores lavam cuidadosamente as mãos ao chegar ao trabalho, antes e após manipular alimentos, após tocar em materiais contaminados, após usar os sanitários e sempre que se fizer necessário.			
São fixados cartazes de orientação sobre a correta lavagem e antissepsia das mãos e demais hábitos de higiene, em locais de fácil visualização, inclusive nos sanitários e lavatórios.			
Os manipuladores não fumam, falam desnecessariamente, cantam, assobiam, espirram, tosem, comem, manipulam dinheiro ou praticam outros atos que possam contaminar o alimento.			
Os manipuladores usam cabelos presos e protegidos por rede, toucas ou outro acessório apropriado para este fim, não sendo permitido o uso de barba.			
As unhas são curtas, sem esmalte ou base. Durante			

a manipulação são retirados todos os objetos de adorno pessoal e maquiagem.			
Os manipuladores são supervisionados e capacitados periodicamente em higiene pessoal, em manipulação higiênica dos alimentos e em doenças transmitidas por alimentos.			
A capacitação é registrada em documento específico.			
Os visitantes cumprem os requisitos de higiene e de saúde estabelecidos para os manipuladores.			
<b>Matérias primas, ingredientes, embalagens</b>			
Existe critérios para avaliação e seleção dos fornecedores de matérias-primas, ingredientes e embalagens.			
Existe área específica para recepção de mercadoria.			
As mercadorias são submetidas à inspeção no recebimento.			
Os lotes reprovados ou com data de validade vencidos são devidamente identificados e armazenados separadamente.			
As mercadorias são armazenadas sobre paletes, estrados ou prateleiras respeitando o espaço mínimo necessário. Os paletes, estrados ou prateleiras são de material liso, resistente, impermeável e liso.			
<b>Preparação do alimento</b>			
A quantidade de funcionários, equipamentos, móveis e ou utensílios disponíveis são compatíveis com a necessidade das preparações.			
Durante a preparação é adotado medida para minimizar o risco de contaminação cruzada.			
Os produtos perecíveis são expostos à temperatura ambiente somente pelo tempo mínimo necessário para preparação.			
Quando o produto não é utilizado em sua totalidade são acondicionados e identificados com as seguintes informações: nome, data de fracionamento, data de validade após a abertura ou retirada da embalagem original.			
Quando aplicável, é feita a adequada limpeza da embalagem primária das matérias-primas e ingredientes.			
É realizada verificação de temperatura dos alimentos produzidos.			
Os óleos e gorduras utilizados são trocados sempre que necessário e aquecidos em temperaturas não superiores a 180°C.			
O descongelamento ocorre à temperatura de refrigeração (inferior a 5°C) ou em forno micro-ondas.			
Os alimentos descongelados não são recongelados.			
Após submetidos a cocção os alimentos devem permanecer a temperatura superior a 60°C por, no máximo 6h.			
Os alimentos resfriados devem ser conservados sob refrigeração (inferiores a 5°C) ou congelado à temperatura igual ou inferior a -18°C.			
É respeitado o prazo máximo de 5 dias para consumo dos produtos armazenados a temperatura de 4°C ou			

inferior.			
Alimentos preparados armazenados sob refrigeração ou congelamento são devidamente etiquetados.			
Alimentos crus são submetidos a processo de higienização.			
<b>Armazenamento e transporte dos alimentos preparados</b>			
A temperatura do alimento preparado é monitorada durante todas as etapas: armazenamento, transporte e distribuição.			
Os veículos destinados para transporte de alimentos preparados são de uso exclusivo para este fim e devidamente higienizados.			
<b>Exposição ao consumo</b>			
A áreas de exposição do alimento são mantidas organizadas e em adequadas condições higiênico-sanitárias.			
Os manipuladores adotam procedimentos de anti-sepsia das mãos ou luvas descartáveis, para minimizar o risco de contaminação.			
Os equipamentos para exposição ou distribuição dos alimentos estão sob temperaturas controladas e em adequado estado de conservação, higiene e funcionamento.			
O equipamento de exposição dos alimentos dispõe de barreiras de proteção que previnem a contaminação.			
Os utensílios utilizados no consumo são descartáveis ou devidamente higienizados e armazenados em local protegido.			
Os ornamentos e plantas existentes na área de consumo não constituem fontes de contaminação para os alimentos.			
A área para recebimento de dinheiro, cartão e outros é reservada e os funcionários destinados para essa atividade não manipulam alimentos preparados, embalados ou não.			
<b>Documentação e registro</b>			
O serviço de alimentação possui Manual de Boas Práticas e Procedimentos Operacionais Padronizados, acessíveis aos funcionários e a autoridade sanitária, quando requerido.			
O POP contem informações sequencias das operações e frequência das execuções, especificando nome, cargo ou função do responsável pela atividade.			
Existe POP para os seguintes itens: Higienização das instalações, móveis e utensílios, controle integrado de vetores e pragas, higienização do reservatório e higiene dos manipuladores.			
<b>Responsabilidade</b>			
O responsável pelas atividades de manipulação dos alimentos é submetido a curso de capacitação, devidamente comprovado.			

## **Apêndice B - Termo de autorização**

Prezado (a) Senhor (a)

Venho por meio deste, solicitar sua autorização para a realização da pesquisa intitulada: **Avaliação das Boas Práticas e Identificação de Fontes de Contaminação de Alimentos Servidos em Restaurantes Hoteleiros.**

Esta pesquisa faz parte de um Projeto de Mestrado, desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas.

O objetivo desta pesquisa é avaliar as boas práticas de fabricação aplicadas em restaurantes hoteleiros da região e determinar a qualidade dos alimentos servidos, tendo como justificativa a intensa movimentação turística na região. Será assegurado o compromisso ético de preservar a identidade dos estabelecimentos envolvidos no estudo.

O (a) senhor (a) receberá uma cópia deste documento onde consta o telefone da pesquisadora para localizá-la a qualquer momento e uma cópia do projeto de pesquisa após aprovação do comitê de ética da UFPEL.

Na certeza de contar com vosso apoio, desde já agradeço colocando-me ao seu inteiro dispor para outros esclarecimentos, se necessário.

Certa de sua colaboração, desde já agradeço.

Atenciosamente,

Aline de Oliveira Rodrigues – Mestranda do PPGNA/FN/UFPEL

Telefone: 53- 9117 22 90 e-mail: [alinerod\\_nut@yahoo.com.br](mailto:alinerod_nut@yahoo.com.br)

Considerando as informações acima, confirmo ter sido informado (a) por escrito e verbalmente dos objetivos desta pesquisa.

Desta forma, eu \_\_\_\_\_  
responsável pelo \_\_\_\_\_ estabelecimento  
\_\_\_\_\_ autorizo a realização desta  
pesquisa neste hotel.

\_\_\_\_\_  
Aline de Oliveira Rodrigues – Responsável pela pesquisa

\_\_\_\_\_  
Responsável pelo estabelecimento



## **Apêndice C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado a participar, como voluntário(a), da pesquisa de **Avaliação das Boas Práticas e identificação de Fontes de Contaminação de Alimentos Servidos em Restaurantes Hoteleiros**. No caso de você concordar em participar, favor assinar ao final do documento. Sua participação não é obrigatória, e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não tratará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador(a) ou com a instituição.

Você receberá uma cópia deste documento onde consta o telefone e endereço do pesquisador(a) principal, podendo tirar dúvidas do projeto e de sua participação.

**NOME DA PESQUISA:** Avaliação das Boas Práticas e identificação de Fontes de Contaminação de Alimentos Servidos em Restaurantes Hoteleiros.

**PESQUISADORA RESPONSÁVEL:** Aline de Oliveira Rodrigues

**ENDEREÇO:** Rua Nilo Peçanha 120, bloco D ap 303 – Bairro Três Vendas

**TELEFONE:** (53) 3273 24 24 / (53) 9117 22 90

**PATROCINADOR:** Universidade Federal de Pelotas - UFPel

**MÉTODO DE SELEÇÃO:** Você foi selecionado por estar trabalhando com produção de alimentos em um dos restaurantes dos hotéis da cidade de Pelotas ou Rio Grande.

**OBJETIVOS:** Avaliar as boas práticas de fabricação aplicadas em restaurantes hoteleiros da região e conhecer a possível fonte de contaminação de alimentos.

**PROCEDIMENTO DO ESTUDO:** Se você concordar em participar da pesquisa, será feita coleta de material de cada uma de suas mãos, através de swab (tipo de cotonete) que será friccionado entre seus dedos e por toda sua mão para posterior análise. Esse método visa avaliar se existe algum contaminante em suas mãos que possa ser repassado para os alimentos.

**RISCOS E DESCONFORTOS:** Esta pesquisa não prevê nenhum tipo de risco para o participante.

**BENEFÍCIOS:** Com os dados dessa pesquisa você poderá conhecer a qualidade dos alimentos produzidos no seu restaurante e quais fatores podem ser melhorados para garantir a segurança alimentar.

**CUSTO/REEMBOLSO PARA O PARTICIPANTE:** Você não terá nenhum gasto com a sua participação na pesquisa e também não receberá qualquer tipo gratificação devido a sua participação.

**CONFIDELIDADE DA PESQUISA:** Asseguramos o sigilo total sobre sua participação na pesquisa.

---

Assinatura do Pesquisador Responsável

Declaro que entendi os objetivos, procedimentos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Local e Data: \_\_\_\_\_

Nome e assinatura do participante da pesquisa:

---