

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO**

**RISCO MICROBIOLÓGICO DO CONSUMO DE SALADAS CRUAS E  
COZIDAS SERVIDAS EM RESTAURANTES SELF SERVICE EM  
CRUZ DAS ALMAS, BAHIA, E A EFICÊNCIA DA ÁGUA SANITÁRIA  
NA HIGIENIZAÇÃO DAS HORTALIÇAS**

**MARLY SILVEIRA SANTOS**

**CRUZ DAS ALMAS-BA  
MAIO - 2014**

**RISCO MICROBIOLÓGICO DO CONSUMO DE SALADAS CRUAS E  
COZIDAS SERVIDAS EM RESTAURANTES SELF SERVICE EM  
CRUZ DAS ALMAS, BAHIA, E A EFICÊNCIA DA ÁGUA SANITÁRIA  
NA HIGIENIZAÇÃO DAS HORTALIÇAS**

**MARLY SILVEIRA SANTOS**

Nutricionista

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2011

Dissertação submetida ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientadora: Norma Suely Evangelista - Barreto

Co-orientadora: Isabella de Matos Mendes da Silva

**CRUZ DAS ALMAS-BA**

**MAIO - 2014**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S237r

Santos, Marly Silveira.

Risco microbiológico do consumo de saladas cruas e cozidas servidas em restaurantes self service em Cruz das Almas, Bahia e a eficiência da água sanitária na higienização das hortaliças / Marly Silveira Santos. \_ Cruz das Almas, BA, 2014.

95f.; il.

Orientadora: Norma Suely Evangelista Barreto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

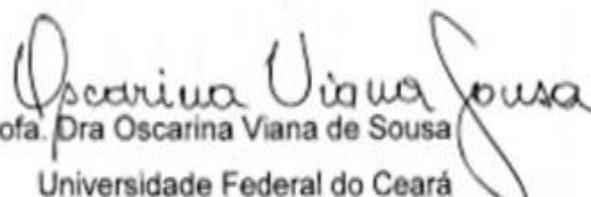
1.Microbiologia – Alimentos. 2.Microbiologia sanitária – Alimentos. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

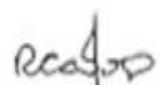
CDD: 576.163

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO  
COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
MÁRLY SILVEIRA SANTOS

  
Profª. Dra. Norma Suely Evangelista-Barreto  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
(Orientador)

  
Profª. Dra. Oscarina Viana de Sousa  
Universidade Federal do Ceará

  
Profª. Dra. Ryzia de Cássia Vieira Cardoso  
Universidade Federal da Bahia

Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_ conferindo o grau de Mestre em  
Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_.

*“Tudo posso Naquele que me Fortalece”*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fornecer o Dom da vida e estar presente em toda a minha caminhada conduzindo sempre os meus passos e aos Orixás pela proteção diária.

Aos meus pais *in memória* por terem me aceitado como filha e a minha família em especial os meus tios (Antonia e Pedro) e minhas primas Ana Lucia e Elis pelo amor e compreensão.

Agradeço aos Professores Evanice e Fabio Oliveira pela amizade, disposição e ajuda.

Agradeço as Técnicas da UFRB, Estevas Freitas e Beatriz Brito pela imprescindível ajuda durante a realização das análises.

Aos meus amigos por terem entendido minha ausência durante a realização deste trabalho. Em especial, Adriana, Viviane, Renato, Alison Eduardo, Danik, Marise, Priscila, Claudia, Machado, Vitor, Vinicius, Paty, Djalma, Maria Luiza, Déa, Rosinha, Ruamã, Ronilson, Alessandra, Simone, Jeu, Polly, Milena, Márcia, Mena, Titela e Marcos.

As minhas amigas de mestrado e colegas de laboratório por terem tornado essa jornada mais leve, pelos muitos momentos de descontração, desabafos, encontros e comemorações. Em especial... Camila, Rebeca (Marley e Eu), Nayara, Irana, Adriana, Carla, Sandrinha, Aura, Sheila, Paulo, Jailza, Brenda, Jessica, Ivane, Virginia, Lucas, Sanmyle e Suelen, e aos Professores do Núcleo de Estudos em Pesca e aquicultura (NEPA), Arlindo, Marcelo e Leopoldo.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Norma Suely Evangelista-Barreto (my the best forever), pela amizade, orientação, confiança, paciência e por mostrar o caminho belo da pesquisa e da docência.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isabella de Matos Mendes da Silva pela co-orientação e compreensão.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse possível.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 02

Página

**Tabela 1.** Valores médios da avaliação microbiológica das saladas cruas (alface e composta) e de maionese servidas nos restaurantes do tipo *self-service* em Cruz das Almas, Bahia, durante o período de junho de 2012 a março de 2013. 59

### CAPÍTULO 03

**Tabela 1.** Média das contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios e coliformes a 45°C nas amostras de alfaces submetidas a quatro tratamentos de higienização usando três diferentes marcas de saneantes a base de hipoclorito de sódio. 82

# INDÍCE

	Página
<b>RESUMO</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	3
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2. OBJETIVO GERAL</b>	16
<b>2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS</b>	16
<b>CAPÍTULO 1</b>	17
<b>Risco no consumo de salada: uma revisão</b>	17
<b>RESUMO</b>	18
<b>ABSTRACT</b>	19
3. Segurança alimentar	20
3.2 Doenças veiculadas por alimentos	21
3.3 Consumo de saladas à base de hortaliça	22
3.4 Bactérias mesófilas heterotróficas aeróbias	23
4. Indicadores Microbiológicos	24
4.1 <i>Salmonella</i>	25
4.2 Coliformes a 45°C	26
4.3 <i>Escherichia coli</i>	27
4.4 <i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	28
5. Resistência antimicrobiana	29
6. Sanitização e eficiência dos saneantes	30
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	31

## **CAPÍTULO 2**

<b>Risco microbiológico das saladas cruas e cozidas servidas em restaurantes <i>self-service</i> em Cruz das Almas, Bahia, Brasil</b>	46
---	----

<b>RESUMO</b>	47
---------------	----

<b>ABSTRACT</b>	49
-----------------	----

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	51
----------------------	----

<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	52
------------------------------	----

2.1 Coleta e obtenção das amostras	53
------------------------------------	----

2.2 Análises microbiológicas	53
------------------------------	----

2.1.1 Contagem de bactérias mesófilas aeróbias	53
--	----

2.1.2 Determinação do grupo dos coliformes (Número Mais Provável)	54
---	----

2.1.3. Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	54
---	----

2.1.4 Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.	55
---	----

2.3 Testes de suscetibilidade antimicrobiana	56
--	----

2.4 Análise estatística	56
-------------------------	----

2.5 Metodologia de amostragem	57
-------------------------------	----

<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	57
----------------------------------	----

<b>4. CONCLUSÃO</b>	63
---------------------	----

<b>5. REFERÊNCIAS</b>	64
-----------------------	----

## **CAPÍTULO 3**

<b>Eficiência de diferentes marcas de água sanitária na higienização de alfaces</b>	72
---	----

<b>RESUMO</b>	73
---------------	----

<b>ABSTRACT</b>	75
-----------------	----

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	77
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	78
2.1 Coleta e obtenção das amostras	79
2.2 Análises microbiológicas	79
2.1.1 Contagem de bactérias mesófilas aeróbias	79
2.2 Análises químicas	80
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	80
<b>4. CONCLUSÃO</b>	86
<b>5. REFERÊNCIAS</b>	86
<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b>	91
<b>ANEXO</b>	92

## RESUMO

### **SANTOS, M. S. Risco microbiológico do consumo de saladas cruas e cozidas servidas em restaurantes *self service* em Cruz das Almas, Bahia, e a eficiência da água sanitária na higienização das hortaliças**

Este trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros bacteriológicos de saladas cruas e cozidas servidas em restaurantes do tipo *self-service* em Cruz das Almas, Bahia. Durante o período de junho de 2012 a março de 2013 foram realizadas coletas quinzenais de saladas (salada de alface, salada composta e salada de maionese) em cinco restaurantes (A, B, C, D e E), perfazendo um total de 45 amostras. Como indicadores de inocuidade foram adotados bactérias heterotróficas mesófilas aeróbicas, coliformes a 45°C, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus* coagulase positiva. Também foram realizados testes de suscetibilidade dos microrganismos isolados, bem como teste de eficiência usando três diferentes marcas de água sanitária em quatro tratamentos T1 (1 colher de sopa/8 mL), T2 (2 colheres de sopa/16 mL), T3 (3 colheres de sopa/24 mL) e T4/Hipoclorito de sódio fornecida pelo ministério da saúde (1 colher de sopa/8 mL). A contagem média para as bactérias heterotróficas mesófilas cultiváveis dentre as saladas foi maior na salada de alface ( $1,25 \times 10^8$  UFC/g), no estabelecimento B, a qual diferenciou estatisticamente da salada de maionese ( $5,5 \times 10^5$  UFC/g). Este comportamento também foi verificado em relação ao estabelecimento A. A contagem de bactérias mesófilas nas saladas composta não apresentou diferença significativa entre as demais, sendo os valores médios de  $6,58 \times 10^6$  UFC/g. Para a presença de *Staphylococcus* spp., a contagem média observada foi de  $5,43 \times 10^2$  UFC/g a  $5,60 \times 10^6$  UFC/g. A salada de alface apresentou as maiores concentrações, seguida pela salada composta e a salada de maionese. A estimativa média para os coliformes a 45°C variou de  $< 3,0$  a  $9,2 \times 10^6$  NMP/g. A salada de maionese diferiu, significativamente, das saladas composta e de alface, as quais apresentaram alta contaminação por coliformes a 45°C. Apenas as saladas de maionese diferiram significativamente entre os estabelecimentos A, C e D, em relação às demais saladas. Das 45 amostras analisadas *Escherichia coli* foi detectada em 11,11% das amostras, apresentando estas suscetibilidade frente a diferentes antimicrobianos de uso comum no tratamento de infecções de humanos. Não foi verificada a presença de *Salmonella*

e *Staphylococcus* coagulase positiva. Para o teste de eficiência usando três marcas de água sanitária e quatros tratamentos, o tratamento T2, T3 e T4 se mostraram eficientes na redução da carga microbiana de coliformes a 45°C e na redução das bactérias mesófilas, sendo que a marca SA, foi a mais eficiente em todos os tratamentos. Quanto ao teor de cloro ativo, todas as marcas se encontraram dentro do limite exigido pela legislação vigente. A elevada carga microbiana nas saladas cruas e cozidas, especialmente na salada de alface, evidência a importância das boas práticas de manipulação em unidades de alimentação, de modo que os cuidados durante as preparações sejam fundamentais para garantir a segurança do alimento ao consumidor. A marca de água sanitária SA, demonstrou ser eficiente em todos os tratamentos na redução da carga microbiana tanto para os coliformes a 45°C como para bactérias heterotróficas mesófilas.

**Palavras chaves:** segurança alimentar, sanitização, hortaliças, inocuidade.

## ABSTRACT

Health risk from the consumption of raw and cooked salads served in self service restaurants in Cruz das Almas, Bahia, and efficiency of the bleach sanitizing of vegetables.

This work aimed to evaluate the bacteriological parameters of raw and cooked salads served in restaurants self-service in Cruz das Almas, Bahia. During the period June 2012 to March 2013, the samples were carried out fortnightly (lettuce salad, mixed salad and mayonnaise salad) in five restaurants (A, B, C, D and E), making a total of fifteen samples. As microbiological indicators were used mesophilic aerobic heterotrophic bacteria, coliforms at 45°C, *Salmonella* e *Staphylococcus* spp. Test susceptibility of microorganisms to different trademark of bleach were conducted using three different bleach and four treatments T1 (8 mL); T2 (16 mL); T3 (24 mL); T4 (8mL) standard sample of Ministry of Health. The study also found the concentration of active chlorine in bleach. The average score for the heterotrophic mesophilic bacteria was higher in the lettuce salad ( $1,25 \times 10^8$  UFC/g), in the restaurant B, which statistically different from mayonnaise salad ( $5,5 \times 10^5$  UFC/g). This behavior was also observed in relation to restaurant A. The mesophilic bacteria found in mixed salad showed no significant difference among the other salads, with mean values of the  $6,58 \times 10^6$  UFC/g. The average number of *Staphylococcus* spp. observed was  $5,43 \times 10^2$  UFC/g a  $5,60 \times 10^6$  UFC/g. A salad of lettuce showed the highest concentrations of *Staphylococcus*, followed by mixed salad and mayonnaise salad. The average estimate for coliforms at 45°C ranged from  $< 3,0$  a  $9,2 \times 10^6$  NMP/g. The salad mayonnaise differed significantly from mixed salad and lettuce salad, which showed high contamination by coliforms at 45°C. Only salads mayonnaise differ significantly between stores A, C and D, in relation the other salads. The 45 samples analyzed *Escherichia coli* were detected in only 11.11%, which showed sensibility to the antibiotics tested. The analyzes did not identify the presence of *Salmonella*. The effectiveness of the disinfectant test was performed using three brands of bleach and four treatments. The treatments T2, T3 and T4 proved effective in reducing coliforms at 45°C and mesophilic bacterial and the mark SA was the most efficient in all treatments. The concentration of active chlorine of all brands were within the limits required by

current legislation. The high microbial load in raw salads and cooked, especially in lettuce salad, highlights the importance of good handling practices in restaurants, so that care during preparations are critical to ensure security of food to consumers. The SA mark proved to be efficient in all treatments in reducing microbial load for coliforms at 45°C both as well as for mesophilic.

**Key words:** Food safety, sanitation, greenery, safety

## INTRODUÇÃO

O Brasil tem se destacado no crescente número de pessoas que realizam refeições fora de seus domicílios (BRASIL, 2009), devido ao ritmo acelerado do cotidiano dos indivíduos, ou seja, dificuldade de locomoção nos grandes centros e principalmente o aumento da mão de obra feminina (ALVES, UENO, 2010)

Acompanhando essa tendência, os restaurantes do tipo *self-service* que comercializam as refeições por peso constituem um segmento do setor de alimentação em expansão. Esse tipo de serviço apresenta vantagens para o consumidor, como a variedade de opções, rapidez no atendimento e baixo custo. Entretanto, alguns fatores preocupam os profissionais da área de alimentação, tais como a insegurança dos alimentos, o maior tempo de exposição em temperaturas inadequadas e o número de pessoas que passam pelo alimento (SOARES, CANTO, 2005).

A inocuidade de uma refeição pode ser influenciada pela qualidade da matéria-prima, higienização dos utensílios, higiene dos manipuladores e o monitoramento do binômio tempo e temperatura (ALVES UENO, 2010). As preparações servidas em restaurantes, principalmente quando se trata de refeições cruas ou adicionadas de molhos, promove uma insegurança alimentar, em virtude de falhas higiênico-sanitárias durante a sua preparação (CORREIA et al., 2011).

Mundialmente a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem incentivado campanhas de estímulo ao consumo de hortaliças e frutas. Esses alimentos são importantes para a composição de uma dieta saudável, uma vez que apresentam uma densidade energética baixa e são ricos em micronutrientes, fibras e outros elementos fundamentais ao organismo (FERNANDES et al., 2002).

Entretanto, as hortaliças, dentre outras culturas são importantes alvos de contaminação, devido às técnicas de cultivo, que faz com que esse grupo seja mais suscetível à contaminação, devido à irrigação com água contaminada por fezes de animais e uso de adubos orgânicos. Além disso, o transporte e as condições higiênico-sanitárias inadequadas durante o manuseio e o preparo, podem contribuir para o aumento de ocorrência das Doenças Veiculadas por Alimentos - DVAs (EUGÊNIO et al., 2010).

As DVAs apresentam como características gerais um curto período de incubação e um quadro clínico gastrointestinal manifestado por diarreia, náuseas, vômito e dor abdominal, acompanhado ou não de febre e com a recuperação rápida do paciente. Embora, casos envolvendo crianças ou idosos debilitados possam apresentar complicações graves, levando até à morte (GERMANO, GERMANO, 2001).

Os principais agentes de contaminação microbiológica em hortaliças são *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae*, fungos filamentosos, leveduras, cistos de protozoários e ovos de helmintos. Além disso, as hortaliças podem albergar bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em decorrência do contato com superfícies contaminadas como equipamentos e utensílios, manipulação ou o ar (FRANCO, LANDGRAF, 2008).

Dados do Ministério de Saúde constataam que de 1999 a 2008 no Brasil foram notificados 6.062 surtos de DVA's envolvendo 117.330 pessoas doentes e 64 óbitos (BRASIL, 2009).

A maioria dos casos de DVA's não é notificado. Este fato está relacionado à questão de muitos micro-organismos patogênicos presentes nos alimentos causarem sintomas brandos, fazendo com que a vítima não busque auxílio médico (COSTALUNGA, TONDO, 2002).

Além dos riscos de DVA's envolvendo as hortaliças, outro fator relevante para a saúde pública é a veiculação de cepas resistentes aos antimicrobianos. O amplo uso de antimicrobianos na medicina humana e na produção animal tem resultado no aumento do número de bactérias comensais e patogênicas resistentes aos agentes antimicrobianos, o que vem se tornando um dos principais problemas de saúde pública (VIEIRA et al., 2006).

As bactérias, embora com baixa patogenicidade para os humanos, mas com resistência antimicrobiana adquirida ou intrínseca, podem transmitir essa característica para os patógenos humanos por meio de genes móveis, como os plasmídeos R (COSTA et al., 2009).

Do total de antimicrobianos produzidos apenas 50% é utilizado na terapia humana. A outra metade é empregada na profilaxia, tratamento ou como promotores de crescimento e no extermínio de pragas na agricultura. Na

produção de hortaliças é comum o uso de esterco na adubação do solo, e assim, a presença de cepas resistentes (MOTA et al., 2005).

A lavagem das hortaliças tem sido a prática mais comum na obtenção de um alimento inócuo. A eficácia no processo da lavagem pode ser melhorada com o uso de soluções sanitizantes que promovem a redução da carga microbiana (TAKAYANAGUI et al., 2012). No Brasil, o hipoclorito de sódio é o único agente sanitizante permitido pela legislação na redução da carga microbiana dos alimentos (BRASIL, 1999). Entretanto, falhas durante o intervalo de contato, bem como a concentração do agente saneante podem não eliminar totalmente os micro-organismos presentes e não apresentar a eficiência esperada (COSTALUNGA, TONDO, 2002).

Baseado nisso, o estudo com saladas cruas ou com molhos é relevante para a saúde pública, por se tratar de alimentos que exigem manipulação intensa e higienização adequada. O hábito em consumir as hortaliças cruas, faz com estes alimentos sejam enquadrados em um grupo de maior risco, merecendo atenção especial por parte dos órgãos da vigilância sanitária. Haja visto, que Organização Mundial de Saúde (OMS) tem incentivado o aumento do consumo de frutas e hortaliças para promover uma alimentação saudável.

## 2.OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a qualidade microbiológica das saladas cruas e cozidas servidas em restaurantes do tipo *self-service* na cidade de Cruz das Almas, Bahia, bem como verificar a veiculação de cepas resistentes a antimicrobianos e testar a eficiência da água sanitária na higienização das alfaces

### 2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar bactérias mesófilas heterotróficas aeróbias cultiváveis, coliformes a 45°C e *Staphylococcus* coagulase positiva;
- Investigar a presença de bactérias entéricas do gênero *Salmonella*;
- Verificar se as saladas cruas e de maionese atendem aos padrões de inocuidade estabelecidos pela legislação vigente;
- Verificar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana das estirpes identificadas;
- Avaliar a eficiência da água sanitária de diferentes marcas na redução da carga microbiana de vegetais folhosos.

---

# **CAPÍTULO 1**

**Risco no consumo de saladas de hortaliças: uma revisão**

---

## RESUMO

### Santos, M. S. Risco no consumo de salada: uma revisão

Nos últimos anos, tem crescido o número de estabelecimentos comerciais de alimentação, em especial, os do tipo *self-service*, onde as saladas são um dos alimentos mais consumidos. Entretanto, a contaminação microbiana desses produtos é relevante para a saúde pública, devido ao risco na transmissão de doenças de origem alimentar. Os principais micro-organismos envolvidos na contaminação de saladas em estabelecimentos de refeição coletiva são as bactérias, os fungos e os vírus, provenientes em geral de matéria-prima contaminada, falhas durante a manipulação dos alimentos, contaminação cruzada e falha na higienização pessoal e dos utensílios. Esses fatores comprometem a inocuidade dos alimentos, expondo a população a riscos alimentares como, por exemplo, a salmonelose. Em virtude disso, a legislação brasileira impõe limites para a presença de algumas bactérias patogênicas de importância para a saúde pública como os coliformes a 45°C, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella*. O risco microbiano que afeta a segurança de alimentos pode estar presente em toda a cadeia produtiva, favorecendo a ocorrência das Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs), fazendo necessária a higienização eficiente. Para uma higienização correta é recomendado a utilização de compostos clorados, onde o mais utilizado e recomendado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o hipoclorito de sódio.

Palavras-chaves: A segurança alimentar, saneamento, hortaliças, alimentos de qualidade.

## **ABSTRACT**

The risk to health from the consumption of salads: a review

In recent years it has grown the number of self-service restaurants where the salads are one of the most consumed foods. However, microbial contamination of these products is relevant to public health because of the risk in the transmission of foodborne diseases. The main microorganisms involved in the contamination of salad in collective establishments are bacteria, fungi and viruses. These are derived from the raw material contaminated, failures during food handling, cross contamination and failure in personal hygiene and utensils. These factors compromise the safety of food, exposing the population to health risks such as salmonellosis. As a result, Brazilian law imposes limits on the presence of some pathogenic bacteria of importance to public health such as coliforms at 45°C, coagulase positive *Staphylococcus* and *Salmonella*. Microbial risk that affects the safety of food may be present in the entire production chain, favoring the occurrence of foodborne disease, necessitating efficient sanitization. For proper cleaning is recommend the use of chlorinated compounds, where the most used and recommended by the National Health Surveillance Agency (ANVISA) is sodium hypochlorite.

**Key words:** Food safety, sanitation, greenery, quality food.

## 1. Segurança de Alimentos

A segurança de alimentos ofertados para o consumo da população tem sido um desafio para os órgãos responsáveis pela saúde pública, visto que a segurança alimentar é uma preocupação mundial, e o acesso a um alimento de qualidade é direito de todo ser humano (SANTOS, 2012).

As doenças de origem alimentar têm despertando interesse no cenário mundial, tornando-se responsáveis por elevados níveis de morbidade e mortalidade na população em geral, principalmente para os grupos de risco como as crianças e jovens, lactentes e idosos imunodeprimidos (WHO, 2012).

Nesse contexto, a segurança de alimentos constitui um importante componente para a qualidade dos alimentos, assegurando ao indivíduo alimentos inócuos, resultando em uma alimentação segura, considerando os hábitos alimentares individuais (PACHECO et al., 2008).

Atualmente, o número de indivíduos que se alimentam fora de casa tem aumentado, em virtude de mudanças no estilo de vida, participação da mulher no mercado de trabalho e o maior número de pessoas residindo em grandes centros urbanos. Todos esses fatores têm contribuído para o crescimento de estabelecimentos que produzem e comercializam alimentos. Os restaurantes do tipo *self-service* se tornaram uma opção rápida e de baixo custo para quem precisa se alimentar fora de casa (FAVARO, 2001).

Entretanto, alguns fatores influenciam diretamente no crescimento de micro-organismos patogênicos que interferem na qualidade desses alimentos, como: (i) condições de higiene em que são preparados; (ii) longo período de tempo e temperaturas a que são submetidos durante a exposição em balcões de distribuição; (iii) matéria-prima de baixa qualidade e; (iv) higienização inadequada dos utensílios, bem como a contribuição dos manipuladores na inoculação de bactérias em alimentos (TRESSELER et al., 2009).

A ingestão de alimentos contaminados com micro-organismos patogênicos muitas vezes ocorre porque os alimentos apresentam aspecto, odor e sabor normais. Este fato também dificulta a investigação de notificação dos surtos, uma vez que o consumidor não consegue identificar qual o alimento seria o responsável pela patologia (FORSYTHE, 2002).

## 2. Doenças Veiculadas por Alimentos

As Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA's) são causadas por agentes, os quais penetram no organismo humano por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados. Estes agentes podem ser químicos como pesticidas e metais tóxicos ou biológicos como os micro-organismos patogênicos. Doenças causadas pela ingestão de plantas tóxicas e micotoxinas também são consideradas DVA's, embora os alimentos contaminados por agentes biológicos sejam a maior causa das enfermidades (NOTERMANS, VERDEGAAL, 1992).

Dados do Ministério de Saúde constataam que de 1999 a 2008 no Brasil foram notificados 6.062 surtos de DVA's envolvendo 117.330 pessoas doentes e 64 óbitos (BRASIL, 2009).

A maioria dos casos de DVA's não é notificado. Este fato está relacionado à questão de muitos micro-organismos patogênicos presentes nos alimentos causarem sintomas brandos, fazendo com que a vítima não busque auxílio médico (COSTALUNGA, TONDO, 2002).

Os sintomas mais comuns das DVA's incluem dor de estômago, náusea, vômitos, diarreia e febre. Porém, dependendo do agente etiológico envolvido, o quadro clínico pode ser agravado, com desidratação grave, diarreia sanguinolenta, insuficiência renal aguda e insuficiência respiratória (MÜRMAN et al., 2008). Dentre os micro-organismos mais envolvidos em surtos alimentares destacam-se *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Clostridium* sulfito redutores a 46°C (FIGUEREIDO et al., 2008).

Segundo dados do Sistema Regional de Informação sobre Vigilância Epidemiológica das Enfermidades Transmitidas por Alimentos (SIRV ETA), coordenado pelo Instituto Pan americano de Proteção de Alimentos e Zoonoses (INPPAZ) da Organização Panamericana de Saúde (OPS/OMS), e apesar do subregistro, ocorreram 6.930 surtos de DVAs em países da América entre 1993 e 2002, dos quais 17,8% foram devidos ao pescado, 16,1% à água, 11,7% às carnes vermelhas e 2.6% às frutas e hortaliças (OPS/OMS, 2005).

No Brasil, no período de 1999 a 2008, os legumes e verduras foram responsáveis por 114 dos surtos de DVA's notificados. Segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS) estes números (>5%) estariam muito aquém do quadro

real. Ainda de acordo com a SVS percebe-se que em 51% e 34,3% dos surtos não se conhece o agente etiológico e o veículo (alimento), respectivamente (SANTOS, 2010).

### **3. Consumo de Saladas à Base de Hortaliças e a Segurança de Alimentos**

A Organização Mundial de Saúde (OMS), cada vez mais, tem realizado campanhas de estímulo ao consumo de hortaliças e frutas. Esses alimentos são importantes para a composição de uma dieta saudável, uma vez que apresentam uma densidade energética baixa e são ricos em micronutrientes, fibras e outros elementos fundamentais ao organismo (FERNANDES et al., 2002).

Entretanto, de acordo com a Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF (POF-IBGE, 2008-2009) menos de 10% da população atinge as recomendações de consumo de frutas, verduras e legumes. A quantidade de hortaliças e frutas consumidas pelo brasileiro se encontra abaixo do mínimo que é 400g diária preconizado pela OMS. No Brasil foi desenvolvido um Guia Alimentar que recomenda o consumo mínimo de seis porções diárias (BRASIL, 2009).

As hortaliças frescas fazem parte da dieta de muitos indivíduos, em razão de seus atributos nutricionais, preparo simples e baixo custo de produção (MAISTRO, 2001).

As hortaliças apresentam em sua microbiota natural uma carga microbiana que provém do ambiente, sendo influenciada pela estrutura da planta, técnicas de cultivo, transporte e armazenamento. A etapa mais crítica para a contaminação do alimento é o plantio, na qual a adubação e a irrigação muitas vezes são realizadas com esterco e água não tratada (FILGUEIRA, 2003). Atualmente, o uso de adubo natural constituído de esterco animal e utilizado no cultivo de hortaliças se popularizou com o advento da agricultura orgânica, representando um risco adicional à transmissão de patógenos intestinais presentes nas fezes dos animais (SANTARÉM, GIUFRIA, CHESINE, 2012).

Para o consumo seguro dos vegetais faz-se necessário a orientação dos manipuladores quanto à importância de sua correta higienização (MASSON, MOGHARBEL, 2005), uma vez que patógenos como *Salmonella* spp. são responsáveis por aproximadamente metade dos casos registrados em surtos de gastroenterite decorrentes da ingestão de vegetais crus (OLIVEIRA, 2010),

destacando-se alface, tomate, melões e brotos verdes e frescos (HEATON, JONES, 2008).

Para garantir a inocuidade do produto é importante que os ingredientes sejam submetidos a uma higienização cuidadosa, principalmente aqueles que serão posteriormente adicionados em preparações já prontas e mantidas sob refrigeração (SEIXAS, 2008).

Em geral, a ingestão de saladas cruas é acompanhada por molhos que também podem atuar como fonte de contaminação. Dentre os diversos tipos de molhos usados no consumo de saladas, de maionese é a mais consumida (MAISTRO, 2001). Nos produtos alimentícios constituídos basicamente por vegetais cozidos e adicionados a maionese, a contaminação e/ou presença de micro-organismos patogênicos pode ocorrer em diferentes fases, desde a sua confecção até o consumo final (LIMA, OLIVEIRA, 2005).

#### **4. Indicadores Microbiológicos**

##### **4.1 Bactérias mesófilas heterotróficas cultiváveis**

As bactérias mesófilas apresentam crescimento amplo, com uma faixa de temperatura de 20°C a 50°C, com ótimo na faixa de 25°C a 40°C (SILVA et al., 2010). Estas bactérias são utilizadas como bioindicadores da qualidade sanitária, sendo úteis para avaliar as condições da matéria-prima, a eficiência dos procedimentos tecnológicos, as condições higiênicas durante o processamento, as condições sanitárias dos equipamentos e utensílios, além das condições de armazenamento e distribuição (FAO, 2009).

A legislação brasileira não estabelece limites para essas bactérias nos alimentos. No entanto, a literatura relata que contagens acima de  $10^7$  UFC/g é indicativo de falhas higienicossanitárias (PAULA et al., 2003).

Em um estudo investigando os níveis de bactérias mesófilas em amostras de alfaces em restaurantes de Niterói, RJ, verificou-se contagens variando de  $2,64 \times 10^6$  UFC/g a  $6,38 \times 10^7$  UFC/g (PAULA et al., 2003). Palú et al. (2003) analisando amostras de hortaliças frescas também relataram contagens para bactérias mesófilas na ordem de  $2,1 \times 10^5$  UFC/g a  $2,7 \times 10^7$  UFC/g.

## 4.2 *Salmonella* spp.

Bactérias do gênero *Salmonella* são patógenos facultativos, intracelulares, capazes de infectar uma grande variedade de alimentos (CARDOSO, TESSARI, 2008). Caracterizam-se por ser bacilos móveis, Gram-negativos, não formadores de esporos, catalase positiva, aeróbicos facultativos, com crescimento variando de 6°C a 46°C, com ótimo de 37°C (SILVA et al., 2010).

O gênero *Salmonella* é composto por apenas duas espécies, *Salmonella enterica* e *S. Bongori*. A espécie *S. entérica* é dividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. entérica* subsp. *arizonae*, *S. entérica* subsp. *diarizonae*, *S. entérica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica* (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

O número de sorovares para cada uma das espécies e subespécies de *Salmonella* é de 2.610, deste total 1.547 pertencem a *S. enterica* subsp. *entérica*, 513 a *S. enterica* subsp. *salamae*, 100 a *S. enterica* subsp. *arizonae*, 341 a *S. enterica* subsp. *diarizonae*, 73 a *S. entérica* subsp. *houtenae*, 13 a *S. enterica* subsp. *indica* e 23 a *Salmonella bongori*, no entanto a uma nova caracterização dos 70 novos Sorovares de *Salmonella* reconhecido entre 2003 e 2007 pelo OMS-Salm: 44 foram atribuídos a *S. entérica* subsp. *enterica*, 11 a subespécie *salamae*, 5 a subsp. *arizonae*, 8 a subsp. *diarizonae*, um a subespécie *houtenae* e um de *S. bongori* (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

A classificação e nomenclatura das salmonelas são baseadas no esquema de Kauffman-White que tem como base a soroaglutinação dos antígenos O (somática), H (flagelar) e Vi (capsular). Os antígenos “O” são organizados por algarismos arábicos (1, 2, 3...) e são responsáveis por caracterizarem os sorogrupos, os antígenos “H” são designados por letras minúsculas do nosso alfabeto, quando a bactéria está na fase 1 e por algarismos arábicos quando está na fase 2. Já o antígeno Vi de caráter polissacarídico é encontrado apenas em três sorovares de *Salmonella* (*S. sor. Typhi*, *S. sor. Paratyphi C* e *S. sor. Dublin*) (TINDALL et al., 2005).

Mundialmente os sorotipos da subespécie *S. enterica* tem sido os mais envolvidos em surtos alimentares atribuídos ao consumo de alimentos, ocasionando diversos internamentos e mortes (POPOFF, 2001). Acredita-se que

em todo mundo ocorram cerca de 93,8 milhões de casos de infecções, acarretando em 155 mil mortes por ano (CAVALLI, SALAY, 2007) As doenças causadas por *Salmonella* são divididas em três grupos: a febre tifoide, causada por *S. Typhi*, as febres entéricas, causadas por *S. Paratyphi* (A, B e C) e as salmoneloses, causadas pelas demais salmonelas. Os sintomas ocorrem entre seis a 48 horas, incluindo febre, dor de cabeça, cólicas abdominais, diarreias, náuseas e ocasionalmente vômitos (SILVA et al., 2010). O período de incubação varia de seis a 72 horas (BALBANI, BUTUGAN, 2001), sendo a dose infectante de 15 a 20 células (CARDOSO, TESSARI, 2008).

Amplamente distribuída na natureza, *Salmonella* tem como principal habitat o trato intestinal do homem e animais. Em função da sua capacidade de disseminação no ambiente, a bactéria pode ser veiculada em diversos alimentos, bem como, por portadores assintomáticos (MARTINS, BARBOSA, 2013).

Em escala global, a salmonelose é uma das zoonoses com maior impacto sobre a saúde pública, devido à elevada endemicidade, alta taxa de mortalidade e, sobretudo, a dificuldade de controle (TESSARI, CARDOSO, CASTRO, 2003).

No Brasil, não existem dados epidemiológicos reais, apesar de se tratar de uma doença de notificação compulsória, uma vez que nem sempre os surtos são notificados às autoridades sanitárias. Isto ocorre porque a maioria dos casos de gastroenterites transcorre sem a necessidade de hospitalização (TEBBUTT, 2007).

Aproximadamente metade dos casos registrados em surtos de gastroenterite decorrentes da ingestão de vegetais crus. Os alimentos mais frequentemente envolvidos são a alface, o tomate, os melões e os brotos verdes frescos (HOFFMAN, 2001). No Brasil, *Salmonella* foi encontrada em amostras de diversas hortaliças como alface, escarola, rúcula e agrião (SANTARÉM, GIUFFRIDA, CHESINE, 2012).

Estudos realizados por Rodrigues et al. (2007) em Porto Alegre-RS, avaliando vegetais minimamente processados relataram *Salmonella* sp. em 66% das amostras de vegetais, 26% dos tubérculos e em 26% das frutas. No Rio de Janeiro, a análise de vegetais crus em alguns restaurantes mostrou a presença de *Salmonella* sp. em 16,6% das amostras (PALÚ et al., 2002).

Pacheco et al. (2002) analisando hortaliças produzidas por uma associação de agricultores, relataram que das 55 amostras analisadas *Salmonella* sp. foi identificada em duas amostras de espinafre.

De acordo com a legislação brasileira *Salmonella* deve está ausente em 25 gramas do alimento (BRASIL, 2001).

#### **4.3 Coliformes a 45°C**

O grupo dos coliformes termotolerantes ou a 45°C tem sido utilizado como indicador de poluição de origem fecal por serem facilmente isolados e identificados a partir de técnicas simples e rápidas (SILVA et al., 2010). Incluem Bactérias Gram-negativas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, não esporogênicas e capazes de fermentar a lactose com produção de gás a 44,5°C ou 45°C durante 24 horas (OLIVEIRA, 2005). Os coliformes são indicadores de falhas higienicossanitárias dos alimentos e das áreas de preparação e/ou armazenamento, sendo isolados em derivados de leite, carnes e verduras (OLIVEIRA et al., 2010).

Dentro do grupo dos Coliformes a 45°C estão inclusos, pelo menos, três gêneros de bactérias *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, sendo os dois últimos, cepas de origem não fecal. A principal vantagem do grupo dos coliformes como indicadores de contaminação é o fato de serem encontrados no intestino de humanos e animais endotérmicos (possuem sangue quente) e serem eliminados em quantidade significativa nas fezes (SILVA et al., 2010).

Segundo a legislação brasileira, o limite estabelecido para a presença de coliformes a 45°C em hortaliças, legumes e similares frescos, *in natura*, preparados (descascados, selecionados ou fracionados) sanificados, refrigerados ou congelados, para consumo direto, é de  $10^2$  NMP/g (BRASIL, 2001).

Tavares, Araujo, Ueno (2009) ao realizarem avaliação microbiológica e parasitológica em verduras comercializadas em Ribeirão Preto-SP, relataram que, das 139 amostras de alfaces avaliadas, 63,3% apresentaram elevadas contagem de coliformes a 45°C.

Guimarães et al. (2003) estudando amostras de alfaces comercializadas em Lavras/MG também relataram contagens de coliformes a 45°C variando de em ordem decrescente, em feiras-livres ( $8,6 \times 10^5$  UFC/g), no sacolões ( $3,8 \times 10^5$

UFC/g) e nos supermercados ( $3,2 \times 10^5$  UFC/g). Os autores atribuem a contagem elevada de coliformes a 45°C, a falhas na produção, transporte, armazenagem ou manipulação das hortaliças, ocorrendo contato dessas verduras com fezes de seres humanos e/ou de animais.

#### **4.4 *Escherichia coli***

Dentro do grupo dos coliformes a 45°C destaca-se a espécie *E. coli*, membro da microbiota intestinal de animais endotérmicos (TOMICH et al., 2005). Pertencente à família Enterobacteriaceae, essa bactéria é Gram-negativa, não esporulada, anaeróbia facultativa, com capacidade de se desenvolver em temperaturas que variam de 7° a 46°C com o ótimo a 37°C. Não apresentam termorresistência, sendo facilmente destruídas a 60°C. O pH neutro proporciona condições ótimas para o seu crescimento, sendo capaz de fermentar a glicose ou lactose com produção de ácido e gás (FRANCO, LANDGRAF, 2006).

O período de incubação da *E. coli* varia de 12 a 72 horas, a contaminação ocorre por meio de manipulação cruzada, utensílios não desinfetados, mãos não higienizadas, principalmente após o uso do banheiro (SILVA JUNIOR, 2006). Os sintomas característicos de infecção intestinal são náuseas, vômitos, dores abdominais, cefaléia, diarreia, febre e mialgia (HOFFMANN, 2001).

Atualmente, são conhecidas cerca de 200 linhagens patogênicas de *E. coli* que dependendo do estado fisiológico do indivíduo representa um elevado risco à vida. As linhagens patogênicas são divididas em categorias de acordo com o tipo de toxina produzida e a doença causada (MARTINS, BARBOSA, 2013).

As principais categorias diarreogênicas de *E. coli* são: enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasora (EIEC), enteroagregativa (EAEC), aderência difusa (DAEC) e produtora de toxina Shiga (STEC) (MARTINS, BARBOSA, 2013).

*Escherichia coli* entero-hemorrágica (EHEC) se destaca por produzir a enterotoxina verotoxina sendo causadora da diarreia sanguinolenta, responsável por pelo menos 60.000 infecções e 50 óbitos nos Estados Unidos. A dose infectante varia de acordo com o tipo de cepa e a idade do indivíduo exposto, bem como o seu estado imunológico (TAVARES, ARAÚJO, UENO, 2009).

Nas infecções enterohemorrágicas e enteroinvasivas a dose infectante é de apenas 10 células, enquanto nas manifestações clínicas enteroxigênicas estima-se que deve haver uma ingestão de 100 milhões a 10 bilhões de bactérias. Surtos de *E. coli* têm sido frequentemente relacionados após ingestão de carne bovina. No entanto, estudos têm demonstrado que *E. coli* se desenvolve e sobrevive em vegetais como alface, cenouras picadas e vários alimentos crus (GERMANO, GERMANO, 2008).

#### **4.5 *Staphylococcus coagulase positivo***

O gênero *Staphylococcus* compreende pequenos cocos Gram-positivos, coagulase e catalase positivos e anaeróbicos facultativos. Apresentam ótimo de crescimento a 37°C, podendo crescer entre 7°C a 48°C. O pH adequado para sua sobrevivência situa-se em torno de 4 a 10, além de crescer em meios contendo de 5 a 75% de NaCl. São membros naturais da microbiota do homem (SILVA et al., 2010).

As doenças causadas por estas bactérias são geralmente agudas e se caracterizam por náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarreia, com período de incubação de uma a seis horas e recuperação entre 24 a 48 horas (GERMANO, GERMANO, 2008).

A presença de estafilococos nos alimentos pode ser interpretada como indicador de contaminação a partir de fossas nasais, boca e pele dos manipuladores, podendo ser transmitida para os alimentos por contato direto ou indireto. Nos alimentos, podem se multiplicar e produzir enterotoxinas a partir de contagens em torno de  $10^6$  UFC/g (TASCI, SAHINDOKUYUCU, OZTURK, 2011)

As toxinas estafilocócicas são termolábeis e estáveis em pH extremo e radiação. Na intoxicação estafilocócica, as enterotoxinas agem no trato gastrointestinal. A ação emética, sintoma observado com maior frequência parece ter sítios localizados no intestino. O estímulo, transferido pelo nervo vago ao centro do vômito, induz a retroperistalsia do estômago e do intestino delgado, provocando vômitos intensivos. A ação diarreica constitui o segundo sintoma mais comum na intoxicação. Embora seu mecanismo de ação ainda não esteja bem esclarecido, causa inflamação e irritação da mucosa do estômago e intestino delgado (BORGES et al., 2008).

Os alimentos mais envolvidos em surtos alimentares são as carnes, produtos derivados de bovinos, suínos, aves e ovos. Atualmente têm sido reportados surtos alimentares envolvendo vegetais crus, uma vez que as saladas são preparações que exigem muita manipulação (PACHECO et al., 2002).

Em um estudo realizado por Palú et al. (2002) com frutas e vegetais frescos e servidos em restaurantes em Minas Gerais, das 30 amostras analisadas foi verificado a presença de *Staphylococcus aureus* em 53,3% das amostras, sendo que duas estirpes produtoras de enterotoxina foram isoladas da salada de alface.

A legislação brasileira estabelece limites de  $10^3$  UFC/g para *Staphylococcus* coagulase positiva apenas em hortaliças, legumes e similares branqueados ou cozidos, inteiros ou picados, consumidas diretamente, incluindo cogumelos (BRASIL, 2001).

## **5. Resistência antimicrobiana**

A resistência antimicrobiana é um problema global de saúde pública causada pelo uso inadequado ou excessivo de antimicrobianos tanto na medicina humana como na produção animal (POLLETO, REIS, 2005). De acordo com a OMS desde a década de 90 vem-se tentando conter o aumento da resistência antimicrobiana (WHO, 2010).

No Brasil, a partir de 2011 foi criada a Resolução RDC N<sup>o</sup> 20, da Anvisa que regulamenta a utilização de antimicrobianos, sendo vetada a sua comercialização em farmácias e drogarias do país sem a apresentação da prescrição médica (BRASIL, 2011).

Segundo Carneiro et al. (2007) apenas 50% dos antimicrobianos produzidos são utilizados na terapia humana, a outra metade é empregada na profilaxia, tratamento ou como promotores de crescimento animal e no extermínio de pragas na agricultura. Ainda segundo o autor, o uso de esterco na adubação das hortaliças pode promover a veiculação de estirpes resistentes nesses alimentos, que muitas vezes são consumidos crus e sem uma higienização adequada.

Em diversos países como os Estados Unidos tem sido relatado cada vez mais o surgimento de cepas de *E. coli* multirresistentes isoladas em diferentes fontes (COSTA et al., 2008). A multiresistência se constitui em uma preocupação para a saúde pública (ANTUNES et al., 2006), visto que a presença de genes de

resistência móveis entre os patógenos microbianos promove a transmissão e a propagação da resistência aos fármacos usualmente utilizados na terapia humana (DEKIC et al., 2010).

Vários são os mecanismos pelos quais os micro-organismos podem escapar dos efeitos dos antimicrobianos, destacando-se: (i) alteração da estrutura molecular dos antimicrobianos; (ii) produção de enzimas que inativam o fármaco; (iii) alteração das proteínas ligadas de pontos-alvo nas paredes das células, alvos modificados da DNA-girase, mutações de permeabilidade e modificações ribossômicas (ANGULO, NARGUND, CHILLER, 2004).

Em virtude da complexidade dos mecanismos de resistência apresentado pelos micro-organismos, a seleção de fármacos adequados a terapia antimicrobiana em surtos alimentares torna-se uma missão cada vez mais difícil, podendo levar ao aumento da morbidade e da mortalidade dos pacientes tratados incorretamente (MEIRELLES-PEREIRA et al., 2002).

Estudo realizado por Melo (2010) testando 36 cepas de *Escherichia coli* de alimentos frente a antimicrobianos, mostrou que do total de isolados, 29 (34,6%) apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano dos 11 testados.

## **6. Sanitização e eficiência dos saneantes**

A lavagem das hortaliças tem sido a prática mais comum, mas uma simples lavagem não assegura a inocuidade do alimento. A eficácia no processo da lavagem pode ser melhorada com o uso de soluções sanitizantes que promovem a redução da carga microbiana (VITORINO et al., 2013).

Dentre os diversos tipos de saneantes utilizados na sanitização das hortaliças, o cloro é o agente químico mais utilizado por ser de baixo custo e fácil aquisição. No entanto, para a sua eficiência é necessário que o cloro esteja em sua forma ativa (ácido hipoclorito), sendo empregado na concentração de 250mg/L (FDA, 2009).

No Brasil, o hipoclorito de sódio é o único agente sanitizante permitido pela legislação que pode ser utilizado na higienização dos alimentos (BRASIL, 1999).

Frequentemente tem sido usado saneantes como vinagres, hipoclorito de sódio, ácido peracético, dentre outros na sanitização de hortaliças (PINHEIRO, 2011). A eficiência dos saneantes vai depender da fisiologia do micro-organismo,

característica da superfície do alimento como rachaduras, fendas e textura, tempo de exposição e concentração do sanitizante, bem como o pH e temperatura (FDA, 2009). Entretanto, falhas durante o intervalo de contato, bem como a concentração do agente saneante podem não eliminar totalmente os microorganismos presentes nos alimentos e assim não apresentar a eficiência esperada (LUNDI et al., 2005).

Fantuzzi et al. (2004), observaram que após a sanitização do repolho por 10 minutos a temperatura ambiente em solução de hipoclorito de sódio a  $200 \text{ mg}^{-1}$ , a redução de bactérias mesófilas alcançada foi de no máximo  $1,8 \log_{10} \text{ UFC}^{-1}$  em relação a amostra controle.

## 7. REFERÊNCIAS

ANGULO, F. J.; NARGUND, V. N.; CHILLER, T. C. Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. **Journal of Veterinary Medicine Series**, Berlin, v. 51, n.8, p. 374-379, 2004.

ALVES, M. G.; UENO, M. Restaurantes *self-service*: Segurança e Qualidade Sanitária dos Alimentos Servidos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 573-580, 2010.

ARENSTEIN, I. R. Dióxido de cloro estabilizado em solução aquosa: coadjuvante tecnológico de alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 107, p. 32-33, 2003.

ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M.S.V.; CAMARA, C.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; CELIDARQUES, S. D.; SILVA, T. M. M. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba v. 16, n. 4, p. 517-524, 2006.

BALBANI, A. P. S.; BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. **Revista de Pediatria**, São Paulo, v.23, n. 4, p.320-328, 2001.

BOREGS, F. M.; ARCURI, F. E.; PEREIRA, L. J.; FEITOSA, T.; KUAYE, Y. A. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados. **Revista Boletim Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 26, n. 1, p. 71-86. 2008.

BAGATIN, A. M.; RIBEIRO, B. A.; TONET, A. Condições sanitárias da alimentação escolar da rede municipal de ensino cidade de Terra Boa, PR.

**Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, Campo Mourão, v.2, n.2, p.104-110, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO da Saúde. Resolução- RDC N° 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Disponível em: 57 <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm)>. Acesso em: 30 de março de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde - Secretária de vigilância em saúde. COVEH/CGDT/DEVEP/SVS/MS. Análise epidemiológica dos surtos de doenças ZANONI, K.; GELINSKI, J. M. L. N. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 10, n. 3, p. 30 - 42, 2013. 12 transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2009\*. [Internet]. 2009 [cited 2012 out 20]. Available from: [http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=2&sqi=2&ved=0CDcQFjAB&url=http%3A%2F%2Fportal.saude.gov.br%2Fportal%2Farquivos%2Fpdf%2Fanalise\\_ep\\_surtos\\_dta\\_brasil\\_2009.pdf&ei=8Y3PULS5FtDOqAHZ-ICYCA&usg=AFQjCNHlijxVNeD5oHvngMshnA7Uyoq85A](http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=2&sqi=2&ved=0CDcQFjAB&url=http%3A%2F%2Fportal.saude.gov.br%2Fportal%2Farquivos%2Fpdf%2Fanalise_ep_surtos_dta_brasil_2009.pdf&ei=8Y3PULS5FtDOqAHZ-ICYCA&usg=AFQjCNHlijxVNeD5oHvngMshnA7Uyoq85A).

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar. **Processamentos de Artigos e Superfícies em Estabelecimentos de Saúde**. Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar. 2.ed. 50 p. Brasília, 2001.

CAVALLI, S. B.; SALAY, E. Gestão de pessoas em unidades produtoras de refeições comerciais e a segurança alimentar. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.20, n.6, p.657-667, 2007.

CARDOSO, P. S. L. A.; TESSARI, C. N. E. *Salmonella* na segurança dos alimentos e na avicultura. Comunicado Técnico, nº 80, Instituto Biológico, São Paulo, v.80, 2008. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_ok.php?id\\_artigo=80](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=80)>. Acesso em: 25 abril de 2014.

CARMO, G. M. I.; ALMEIDA, D. A.; BERTO, L. H.; Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico** (online), Brasília, v.5, n.6, p. 71-86, 2008. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim\\_eletronico\\_ano05\\_06.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim_eletronico_ano05_06.pdf)>

CARNEIRO, D. O.; FIGUEREIRO, H. C. P.; PEREIRA, D. J.; LEAL C. A. G.; LOGATO, P. V. R. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 4, p.869-876, 2007.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E. C. Salmonellose in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.33, n.4, p.342-346, 2002.

COSTA, M. M.; MABONI, F.; WEBER, S. S.; FERRONATOF, A. I.; SCHIRANK, I. S.; VARGAS, A. Patótipos de *Escherichia coli* na suinocultura e suas implicações ambientais e na resistência aos antimicrobianos. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 3, p. 509-516, 2009.

COSTA, A. A.; JUNIOR V. M. de S.; COELHO A. F. S. Avaliação microbiológica de saladas de vegetais servidas em restaurante *Self-Service* na Cidade de Palmas, To. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 22, n. 159, p. 27-32, 2008.

CORRÊA, T. A. F.; SILVA, M. G.; BALESTRIN, E. C.; RALL, V. L. M. Eficiência da lavagem e dos desinfetantes sobre coliformes termotolerantes em vegetais frescos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 25, n.14. p.154-157, 2011.

CAMARGO, S. B. C.; LOURENÇO, D. C.; SILVA, D.; ROMANELLO, G. R. H.; MARTINEZ, R. Infecção de vias urinárias na comunidade de Ribeirão Preto, SP: etiologia, sensibilidade bacteriana a antimicrobianos e implicações terapêuticas.

**Revista de medicina de Ribeirão Preto**, Ribeirão Preto, v.35, n.2, p.173-178,2002.

DEKIC, B.; DEKIC, V.; RADULOVIC, N.; VUKICEVIC, R. Synthesis of new antimicrobial 4-aminosubstituted 3-nitrocoumarins. **Chemical Papers**, Bratislava, v. 64, n. 3, p. 354-359, 2010.

EUGÊNIO, A. L. F.; PAULA, G. C. E.; TEIXEIRA, R. B.; DELVIVO, F. M. Análise das condições higiênicas-sanitárias de saladas cruas servidas nos restaurantes Popular de Belo Horizonte, MG. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 22 n.167, p. 30-32, 2010.

FAO/OIE/WHO. Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. In: **Report of a joint FAO/OIE/WHO expert consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance**, p.107, 2008, Disponível em: < [ftp://ftp.fao.org/ag/agn/food/aquaculture\\_rep\\_13\\_16june2006.pdf](ftp://ftp.fao.org/ag/agn/food/aquaculture_rep_13_16june2006.pdf). Acesso em: 24 de fevereiro de 2013.

FANTUZZI, E.; PUSCHMANN, R.; VANET, M. C. D. Microbiota contaminante em repolho minimamente processado. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.2,p. 207-11, 2004.

FAVARO, S. P.; NOGUEIRA, R. B.; YONEMITUS, C. F.; SHIMOKOMAKI, M. Possibilidades de implementação de um programa de análise de perigos pontos críticos de controles (APPCC) na preparação de salada de alface no restaurante da Universidade Estadual de Londrina. **Revista Ciências Agrárias**, Londrina, v. 22, n.2, p. 185-190, 2001.

FIGUEIREDO, I. C. R; JAIME, P. C.; MONTEIRO, C. A. Fatores associados ao consumo de frutas, verduras e legumes em adultos na cidade de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, n.42 , v.5, p.777-785, 2008.

FERNANDES, A. A.; MARTINEZ, H. E. P.; PEREIRA, P. R. G.; FONSECA, M. C. M. Produtividade, acúmulo de nitrato e estado nutricional de cultivares de alface, em hidropônia, em função de fontes de nutrientes. **Revista Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 195-200, 2002.

FILGUEIRA, F. A. R. Agrotecnologia moderna na produção comercialização de hortaliças. **Novo Manual de Oleicultura**. 2. ed. Viçosa, 2003. 412p.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce (2009)**. Disponível em: < [http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFood Processes](http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses) >. Acesso em 01 de nov. de 2013.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Ed. Atheneu: São Paulo. 2008 182p.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, p.424,2002.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Agentes Bacterianos de Toxinfecções. In: **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**, 4.ed. São Paulo: Varela, p.234-238, 2001.

GOMES, A. H. S.; ARMELIN, I. M.; BERNARDES, R. Condições higiênicosanitárias de verduras e legumes comercializados no Ceagesp de Sorocaba- SP. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 101, p. 50-55, 2002.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKMEU, J.; PATRICK, A. D.; FRANCIS, G. W. Supplement 2003 e 2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Revista Research in Microbiology**, Paris, v. 161, p. 26-29, 2010.

GUIMARÃES, A. M.; ALVES, E. G. L.; FIGUEIREDO, H. C. P.; COSTA, G. M.; RODRIGUES, L. S. Frequência de enteroparasitas em amostras de alface (*Lactuca sativa*) comercializadas em Lavras, Minas Gerais. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 5, p. 132-135, 2003.

HOFFMAN, L. F. Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos. **Revista Brasil Alimentos**. São José do Rio Preto, v.3, n. 9, p.23-30, 2001.

JUNIOR, J. P.; GONTIJO, E. E. L.; SILVA, M. G. Perfil parasitológico e microbiológico de alfaces comercializadas em restaurantes *self-service* de Gurupitô. **Revista Científica do ITPAC**, Araguaína, v.5, n.1, Pub.2, 2012.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**, 6. ed. Porto Alegre: Atmed, 2005. 721p.

LIMA, J. X.; OLIVEIRA, L. F. O crescimento do restaurante *self-service*: aspectos positivos e negativos para o consumidor. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo ,v.10, n.19, p.45-53, 2005.

LUNDI, D. G.; PETRINI, L. A.; GUIMARÃES, J. A.; ROMBALDI, C. V. Uso de sanitizantes na redução da carga microbiana de mandioca minimamente processada. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.6, p.1431-1435, 2005.

MAISTRO, L. C. Alface minimamente processada: uma revisão. **Revista de Nutrição**, São Paulo, v.14, n. 3, p. 119-224, 2001.

MARTINS, S. F.; BARBO, F. H. F. O Gênero *Salmonella*: Estratégias para causar danos. **Arquivo Brasileiro de Microbiologia Básica e Aplicada**, Macapá, v.1, n.1, p.16-18, 2013.

MASSON, M. L.; MOGHARBEL, A. D. I. Perigos associados ao consumo da alface, (*Lactuca sativa*), in natura. **Revista Alimentação e Nutrição**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 83-88, 2005.

MENDONÇA, S. C.; CORREIA, R. T. P.; ALBINO, E. Condições higiênic-sanitárias de mercados e feiras livres da cidade de Recife-PE. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, nº 94, p.20-25, 2002.

MEIRELLES-PEREIRA, F.; PEREIRA, A. M. S.; SILVA, M.C. G.; GONÇALVES, V. D.; BRUM, P. R.; CASTRO, E. A. R.; PEREIRA, A. A.; ESTEVES, F. A.; PEREIRA, J. A. A. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.33, p.287-293, 2002.

MONTANHER, C. C.; CORADIN, D. C.; SILVA, S. E .F. Avaliação Parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas em restaurantes *Self-Service* por quilo, da cidade de Curitiba, Paraná, Brasil. **Revista Estudo Biologia**, Curitiba, v. 29, n. 66, p. 63-71, 2007.

MAISTRO, L. C. Alface minimamente processada: uma revisão. **Revista de Nutrição**, São Paulo, v.14, n. 3, p. 119-224, 2001.

MEHROTRA, M., WANG, G., JOHNSON, W. M., Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1 and Methicillin Resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, n.12, p. 1032–1035. 2000.

MELO B. D. **Padrão clonal e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de cepas *Escherichia coli* isoladas de alimentos e de Espécimes clínicas.** 2010. 67f. (Dissertação) Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos Faculdade de Farmácia/ Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2010.

MONTANHER, C. C.; CORADIN, D.C.; SILVA, S.E.F. Avaliação parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas em restaurantes *self-service* por quilo, da cidade de Curitiba, Paraná, Brasil. **Revista Estudo Biologia**, Curitiba, v. 29, n. 66, p. 63-71, 2007.

MOTA, A. A. R.; SILVA, C. P.K; FREITAS, L. M.; PORTO, N.I. W.; SILVA, G.B. L. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Revista de Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

MÜRMANN, L.; SANTOS, M. C.; LONGARAY, S. M.; BOTH, J. M. C.; CARDOSO, M. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.39, n.2, p. 529-534, 2008.

NASCIMENTO, F. C. A. Aspectos sócio-econômicos das doenças veiculadas pelos alimentos. **Revista Nutrição em Pauta**, São Paulo, v.40, n.10, p.22-26, 2000.

NASCIMENTO, R. A.; FILHO, M. E. J.; FILHO, M. E. V.; MARTINS, A. L. G. A.; MARINHO, C. S.; SERRA, C. L. C.; ALVES, C. M. Avaliação da sensibilidade de antimicrobianos a cepas enterobacterias isoladas de amostras de alface (*Lactuca sativa*) comercializada na cidade de São Luis–MA, **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.2 , p. 25-26, 2005.

NASCIMENTO, A. R.; FILHO, M.; ELIAS, J.; BARBOSA, A. B.; MARQUES.; PIRES, M. C. Sanitização de saladas *in natura* oferecidas em restaurantes *self-service* de São Luis, MA. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.92, p.63- 67, 2002.

NASCIMENTO, M. S. Avaliação comparativa de diferentes desinfetantes na sanitização de uva. **Brazilian Journal of Food Technology**, São Paulo, v.6, n.1, p.63- 68, 2003.

NOTERMANS, S.; HOOGENBOOM-VERDEGAAL, A. H. Existing and emerging foodborne diseases. **International Journal of Food Microbiology**, New Delhi, v.15, n.3, p.197-205,1992.

OLIVEIRA A. B. A., **Comparação de diferentes protocolos de higienização de alface (*Lactuca sativa* L) utilizados em restaurantes de Porto alegre.** 2005. 65f. (Dissertação) Programa de Pós- graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

OLIVEIRA, P. G. C.; RODRIGUES, S. E. S.; ALMEIDA. C. G. L.; FIGUEIREDO, F. R.; RODRIGUES, F. F. G.; OLIVEIRA. A. D. L.; COSTA, J. G. M. Análises microbiológicas e parasitológicas de saladas verdes servidas em *self-service* no município de Crato – Ceará. **Caderno de Cultura e Ciência**, Cariri, v. 2, n. 2, p.21-23, 2010.

OLIVEIRA, P. G. C.; RODRIGUES, S. E. S.; ALMEIDA, C. G. L.; FIGUEIREIRO, F. R.; RODRIGUES, F. F. G.; OLIVEIRA, A. D. L.; COSTA, J. G. M. Análises microbiológicas e parasitológicas de saladas verdes servidas em *Self-service* no município de Crato – Ceara. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 2, n.2, p. 535-537,2010.

PAULA, R. P.; TORTORA, J. C. O.; UCHOA ,C. M. A.; RARAGE, S. Contaminação microbiológica e parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa*) de restaurante *self-service*, de Niterói, RJ. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, n.36, v.4, p.535-537, 2003.

PALÚ, A. P.; TIBANA, A.; TEIXEIRA, L. M.; MIGUEL, M. A. L.; PYRRHO, A. S.; LOPES, H. R. Avaliação microbiológica de frutas e hortaliças frescas servidas em restaurantes *self-service* privados da Universidade Federal do Rio de Janeiro. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.100, p. 67-73, 2002.

PACHECO, M. A. S. R.; FONSECA, Y. S. K.; DIAS, H. G. G.; CÂNDIDO, V. L. P.; PINHEIRO, M. B.; WADAL, T. C.; PEREIRA, C. A. Análise microbiológicas de tábuas de manipulação de alimentos de uma instituição de ensino superior em São Carlos, SP. **Revista Simbio-Logias**, Botucatu, v.3, n.5,p. 24-26, 2010.

PACHECO, M.A.S.R.; FONSECA, Y.S.K.; DIAS, H.G.G.; CÂNDIDO, V.L.P.; GOMES, A.H.S.; ARMELIN, I.M.; BERNARDES, R. Condições higiênicosanitárias de verduras e legumes comercializados no Ceagesp de Sorocaba-SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 101, p. 50-55, 2002.

PINHEIRO, N. M. S.; FIGUEIREDO, E. A. T.; FIGUEIREDO, R. W.; MAIA, G. A.; SOUZA, P. H. M. de. Avaliação da qualidade microbiológica de frutos minimamente processados comercializados em supermercados de Fortaleza. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.1, p.153-156, 2005.

POPOFFTY, M.Y. (Guidelines for the Preparation of *Salmonella* Anti-sera, 6th Revision. Paris: WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur, 2001.

POLETTI, Q. K.; REIS, C. Suscetibilidade antimicrobiana de uropatógenos em pacientes ambulatoriais na Cidade de Goiânia, GO. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 5, p. 416-420, 2005.

RODRIGUES, C. S. **Contaminação microbiológica em alface e couve comercializadas no varejo de Brasília-DF**. 2007. 29f. (Monografia). Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

SANTOS, L. C.; FARIA, L. A.; SIMM, E. M.; BECHULLFT, M. Avaliação da qualidade microbiológica da alface (*Lactuca Sativa*), comercializada na cidade de Pará de Minas, MG. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 25, n.14 p. 148-152, 2011.

SANTARÉM, A. V.; GIUFFRIDA, R.; CHESINE, F. A. P. Contaminação de hortaliças por endoparasitas e *Salmonella spp.* em Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. **Revista Colloquium Agraria**, Presidente Prudente, v.8, n.1, p.18-25, 2012.

SILVA, J. E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação**. 6 ed. São Paulo: Varela, 2006, 624 p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 2010, 220 p.

SOARES, B.; CANTOS, G. A. Qualidade parasitológica e condições higiênicas sanitárias de hortaliças comercializadas na cidade de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira Epidemiologia**, São Paulo, V. 8, n.4 p. 377-84, 2005.

SREBERNICH, S. M. Utilização de dióxido de cloro e do ácido peracético como substitutos do hipoclorito de sódio na sanitização do cheiro-verde minimamente processado. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v.27, n.4, p.744-50, 2007.

SACCOL, A. L.; SERAFIM, A. L.; STANGARLIN, L.; CÁS, M. R. D. Importância De Treinamento de Manipuladores em Boas Práticas. **Revista Ciências da Saúde**, São Caetano do Sul, v. 7, n. 1, p. 91-99, 2006.

SEIXAS, F. R. F. **Verificação Das Boas Práticas De Fabricação (BPF) E Análise Da Qualidade Microbiológica De Saladas Adicionadas De Maionese Comercializadas Na Cidade De São José Do Rio Preto – SP**. 2008. 89f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2008.

SILVA Jr. E. A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos**. 4 ed. São Paulo: Varela, 2001, 105p.

SILVA Jr., E.A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos**. 6 ed. São Paulo: Varela, , 2010,105p.

SUMATHI, S.; CINDY, F.; LINDA, C.; ROBERT, F. Fresh Produce: A Growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. **Journal of Food Protection**, Iowa, n.10, v.4, p. 234-235, 2004.

TAKAYANAGUI, O. M. Fiscalização de verduras comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.6, n. 34, p. 37-41, 2001.

TAKAYANAGUI, O. M, OLIVEIRA, C, BERGANIM ,A. M. M.; CAPUANO, D. M.; OKINO, M. H. T, FEBRÔNIO, L. H. P, . Fiscalização de verduras comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 34, p. 37-42, 2012.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M. Prevalência de *Salmonella enteritidis* em carcaças de frango industrialmente processadas. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 107, p. 52-55, 2003.

TAVARES, T.; ARAÚJO A. L. U. S.; UENO M. Patógenos veiculados por saladas de alface servidas em restaurantes. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 23, n. 172, p. 136-141, 2009.

TEBBUTTI, G. M. Does microbiological testing of foods and the food environment have a role in the control of food borne disease in England and Wales. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 883-891,2007.

TASCI, F., SAHINDOKUYUCU, F.; OZTURK, D. Detection of *Staphylococcus* species and staphylococcal enterotoxins by ELISA in ice cream and cheese consumed in Burdur Province. **African Journal of Agricultural Research** ,v. 6, p 937-942, 2011.

TRESSELER, M. F. J.; FIGUEIRO, T. A. E.; MACHADO, F. T.; FIGUEIREDO, W.R.; DELFINO, C. M.; SOUZA, M. H. P. Avaliação da Qualidade microbiológica de Hortaliças minimamente. **Revista Ciências Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n.6, p. 1722 -1727, 2009.

TINDALL, B. J.; GRIMONT, P. A. D.; GARRITY, G. M.; EUZEBY, J. P. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 55, n.8, p. 521-522, 2005.

TOMICH, R. G. P.; TOMICH, T. R.; AMARAL, C. A. A.; JUNQUEIRA, R. G.; PEREIRA, J. G. Metodologia para avaliação das boas práticas de fabricação em indústrias de pão de queijo. **Revista Ciência e Tecnologia Alimentar**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 115 – 120, 2005.

SALEZ, L.; MALO, D. Protagonists of innate immunity during in *Salmonella* infections. **Revista Science Medicine**, Canadá, v. 20, n.14, p. 1119-1124, 2004.

VIEIRA, R. H. S. F.; ATAYDE, A. M.; CARVALHO, R. M. E.; CARVALHO, T. C. F.; FILHO, F. A. A. Suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de infecções do trato urinário de pacientes atendidos no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza, Belém – PA. **Revista Brasileira de Análise Clínica**, São Paulo, v.39. n.2, p.119-121, 2007.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Initiative to Estimate the Global Burden of Foodborne Diseases. A summary document [Internet]. 2012 [cited 2012 jun 21]. Available from:[http://www.who.int/foodsafety/foodborne\\_disease/en/](http://www.who.int/foodsafety/foodborne_disease/en/)

---

## **CAPÍTULO 2**

**Risco microbiológico das saladas cruas e cozidas servidas em restaurantes *self-service* em Cruz das Almas, Bahia, Brasil**

---

Este artigo será submetido à Revista Alimentos & Nutrição.

## **Risco microbiológico do consumo de saladas cruas e cozidas servidas em restaurantes *self-service* em Cruz das Almas, Bahia, Brasil**

Marly Silveira Santos<sup>1</sup>, Norma Suely Evangelista-Barreto<sup>2</sup>, Rebeca Ayala Rosa da Silva<sup>3</sup>, Nayara Alves Reis<sup>3</sup>, Fernanda de Souza Bernardes<sup>4</sup>

---

Discente do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - CCAAB, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB.

<sup>2</sup>Professor adjunto, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - CCAAB, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB.

<sup>3</sup>Mestanda do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - CCAAB, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB.

<sup>4</sup>Bolsista PND, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - CCAAB, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB.

\*Autora para correspondência: marly.nutr@hotmail.com

### **RESUMO**

O aumento no número de estabelecimentos do tipo *self-service* se deve a oferta rápida de refeições, com cardápio variado e baixo custo. As hortaliças apesar de se encontrarem entre as preparações mais procuradas nesses estabelecimentos, representam um risco à saúde pública, por se tratar de um alimento com elevada manipulação e falhas na higienização. Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de saladas cruas (alface e composta) e cozidas (maionese) servidas em restaurantes do tipo *self-service*, em Cruz das Almas, Bahia, bem como verificar o perfil de resistência microbiana dos isolados. Durante oito meses foram analisadas amostras de saladas cruas e cozidas em cinco estabelecimentos perfazendo um total de 45 amostras. Como indicadores de qualidade utilizou-se bactérias heterotróficas cultiváveis, coliformes a 45°C, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella*. Para testar a suscetibilidade antimicrobiana foram utilizados cinco antimicrobianos de quatro famílias. A contagem média para as bactérias heterotróficas cultiváveis dentre as saladas foi identificada na salada de alface ( $1,25 \times 10^8$  UFC/g) no estabelecimento B, a qual estatisticamente diferenciou da salada de maionese ( $5,5 \times 10^5$  UFC/g). Este desempenho também foi verificado em relação ao estabelecimento A. A contagem

de bactérias mesófilas nas saladas composta não demonstrou diferença significativa entre as demais, sendo os valores médios de  $6,58 \times 10^6$  UFC/g. Para a presença de *Staphylococcus* spp. nas saladas, a contagem média observada foi de  $5,43 \times 10^2$  UFC/g a  $5,60 \times 10^6$  UFC/g. A salada de alface apresentou as maiores concentrações, seguida pela salada composta e a salada de maionese. A contagem média para os coliformes a 45°C variou de  $< 3,0$  a  $9,2 \times 10^6$  NMP/g. Constatou-se que a salada de maionese diferenciou, significativamente, das saladas composta e de alface, as quais apresentaram alta contaminação por coliformes a 45°C. Em relação aos estabelecimentos (A, C e D) a salada de maionese diferenciou significativamente em relação às demais saladas. Das 45 amostras analisadas, em 11,11% foi detectada a presença de *Escherichia coli*. *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva esteve ausente em todas as amostras analisadas. As cepas de *E. coli* testadas frente aos antimicrobianos, não apresentaram resistência antimicrobiana. A elevada carga microbiana por bactéria heterotróficas cultiváveis *Staphylococcus* spp. e coliformes a 45°C, indica que as saladas estão sendo manuseadas em condições higiênicossanitárias impróprias, se fazendo necessário introduzir e reforçar Boas Práticas de Manipulação e treinamento efetivo dos manipuladores, visando a redução do risco de doenças transmissíveis por alimentos.

**Palavras chaves:** hortaliças, resistência, perfil microbiológico, serviço de alimentação, higiene dos alimentos.

## ABSTRACT

Microbiological risk from the consumption of raw and cooked salads served in self-service restaurants in Cruz das Almas, Bahia, Brazil.

The increase in the number of self-service restaurants is due to providing quick meals, with varied menu and low cost. Greenery is one of the most sought after restaurants in these preparations and represent a risk to public health, because it is a food with high handling and hygiene failures. This study aimed to evaluate the microbiological quality of raw salads (lettuce and mixed), and cooked (mayonnaise) served in self-service restaurants in Cruz das Almas, Bahia, so how to check the profile of resistance of the isolates. During eight months of raw and cooked samples were analyzed in five salads self-service restaurants, completing 45 samples. As quality indicators was used cultivable heterotrophic bacteria, coliforms at 45°C, coagulase positive *Staphylococcus* and *Salmonella*. To evaluate the susceptibility of microorganisms five antimicrobial, belonging to four groups were used. The highest average count of cultivable heterotrophic bacteria was identified in lettuce salad ( $1,25 \times 10^8$  UFC/g) in restaurant B, which statistically different from mayonnaise salad ( $5,5 \times 10^5$  UFC/g). This performance was also observed in relation to property A. Mesophilic bacteria in mixed salads showed no significant difference between other salads and the average values of  $6,58 \times 10^6$  UFC/g. The presence of *Staphylococcus* spp. in salads, the average score observed from  $5.43 \times 10^2$  UFC/g to  $5,60 \times 10^6$  UFC/g. A salad of lettuce showed the highest concentrations of *Staphylococcus*, followed by salad mixed of mayonnaise salad. The average score for coliforms at 45°C ranges from  $< 3.0$  to  $9.2 \times 10^6$  MPN/g. It was found that the salad mayonnaise differed significantly from mixed and lettuce salads, which showed high contamination by coliforms at 45°C. In restaurants A, C and D, salad mayonnaise differed significantly in relation to other salads. Among 45 samples, 11.11% was detected the presence of *E. coli*. No verified the presence of *Salmonella* between samples. The presence of *Salmonella* was not found among the samples. Strains of *Escherichia coli* showed no resistance to the antimicrobials. The high microbial load by mesophilic, *Staphylococcus* spp. and coliformes a 45°C, evinced that these foods were produced in improper sanitary conditions. It is necessary to introduce and reinforce good handling practices and effective training of handlers that are involved in the

preparation of salads, aiming thereby reducing the risk of diseases transmitted by food.

**Key words:** Greenery, resistance, microbiological profile, food service, quality food.

## INTRODUÇÃO

De acordo com a Vigilância Sanitária do município o numero de restaurantes do tipo *self-service* oscilam em torno de 16, embora nem todos ofereçam apenas o serviço de restaurante, ou seja, refeição coletiva com serviços de panificação, refeição coletiva com serviços de xerox, dentre outros.

Cruz das Almas é um município do Recôncavo da Bahia, que apresenta uma população estimada de 63.200 habitantes. Por se tratar de uma cidade universitária, compreende ainda 15 mil moradores flutuantes que residem na cidade durante o período letivo (DIAS, SILVA, CASTROS, 2013). Este fato contribuiu para o aumento no número de estabelecimento comerciais, principalmente do gênero alimentício.

Os estabelecimentos do tipo *self-service* são caracterizados por dispor todos os pratos do cardápio, de forma que os clientes possam se servir dos alimentos de sua preferência, na ordem e quantidade desejada (ALVES, UENO, 2010). O aumento na procura de refeições fora do lar em unidades de alimentação e nutrição (UAN) é atribuída a mudanças sócio-econômicas ocorridas nos últimos anos, como a procura por centros urbanos, a industrialização e a inserção da mulher no mercado de trabalho (AKUTSU et al., 2005).

Dentre as refeições que mais compõem os balcões de distribuição, destacam-se as saladas, devido à mudança de hábito alimentar da população que busca um estilo de vida mais saudável e a prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (FILGUEIRA, JAIME, MONTEIRA, 2008). Apesar dos alimentos apresentarem uma microbiota natural em sua superfície, a contaminação por patógenos ocorre em virtude de falhas na manipulação, preparo e higienização dos vegetais (EUGENIO et al., 2010).

As frutas e vegetais frescos tem sido cada vez mais reconhecidos como fonte de surtos de origem alimentar em diversas partes do mundo. No Brasil, no período de 1999 a 2008, os legumes e verduras foram responsáveis por 114 dos

surtos de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs) notificados. Segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS) estes números (>5%) ainda estão muito aquém do quadro real, devido os sintomas brandos da doença (SANTANA, et.al., 2010).

Dentre os principais patógenos veiculados em DVAs se destacam *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* O157:H7 (LYNCH, TAUXE, HEDBERG, 2009; CDC, 2010). Os surtos de salmonelose envolvem diferentes tipos de alimentos quanto o tipo de serviços de alimentos, tendo sido relatado a bactéria em amostras de alface (SALEZ, MALO, 2004).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* estão relacionadas à manipulação dos alimentos, uma vez que os manipuladores são portadores da bactéria. Vários casos de intoxicação alimentar têm sido relatados envolvendo *Staphylococcus aureus*, especialmente em hortaliças (OLIVEIRA, FREITAS, MUNIZ, 2006). O gênero *Escherichia* tem como habitat primário o trato gastrintestinal de humanos e outros animais endotérmicos, sendo considerado um indicador de contaminação de origem fecal recente. Embora a maioria das linhagens de *Escherichia coli* não apresente patogenicidade, algumas cepas são responsáveis por surtos alimentares como a *E. coli* O157:H7 (WANG et al., 2012).

Além das DVAs, outro fator que tem preocupado os gestores da área de saúde é o aumento da resistência antimicrobiana dos micro-organismos. A elevada resistência de alguns patógenos tem dificultado ou mesmo inviabilizado o tratamento de algumas DVAs (CAMPO, 2007). A resistência microbiana ocorre devido a pressão seletiva na população bacteriana e a troca de genes de resistência móveis entre os patógenos (LYNCH et al., 2006).

Algumas estipes resistentes podem ser veiculada através da adubação com uso de esterco em hortaliças, tornando se preocupante por este ser um produto consumido cru sem um tratamento na sua cadeia produtiva e uma higienização adequada (KLAIBER et al., 2005).

A realização de uma avaliação da qualidade microbiológica das saladas cruas e cozidas servidas nos restaurantes *self-service* no município de Cruz das Almas é relevante, haja visto, que são preparações que passam por intensa manipulação e sem tratamento térmico. Além disso, a eficiência para evitar falhas na higienização das saladas necessitar de um grau de treinamento dos

manipuladores . Neste sentido, este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica das saladas cruas e cozidas servidas nos restaurantes *self-service* de Cruz das Almas, Bahia, bem como analisar o perfil de resistência microbiana das cepas isoladas

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Coletas das Amostras**

Como bioindicadores de qualidade foram usados a quantificação de micro-organismos heterotróficos cultiváveis, coliformes a 45°C e *Staphylococcus* coagulase positivo, bem como a detecção de *Escherichia coli* e *Salmonella* sp.. As análises microbiológicas foram realizadas no período de março de 2012 a abril de 2013, em cinco restaurantes do tipo *self-service*, localizados no município de Cruz das Almas, Bahia. Os critérios utilizados para a escolha dos estabelecidos foi eles serem do tipo *self-service* e aceitação da pesquisa pelos proprietários. Os estabelecimentos se caracterizam por apresentarem um público alvo de professores universitários, além de atingir a classe media e alta da sociedade cruzalmense, ou seja, de médio porte, sendo que os mesmo possuíam alvará de funcionamento, embora não apresentassem o alvará sanitário.

Para a identificação dos estabelecimentos foram atribuídas as letras A, B, C, D e E. Dentre as saladas cruas foram analisadas saladas somente alface e composta (cenoura ralada, beterraba ralada e tomate) e para as saladas cozidas, apenas a maionese, perfazendo um total de 45 amostras. As coletas eram realizadas no horário das 11:30 h, ou seja, após a disposição das preparações no balcão de distribuição.

#### **2.1.1 Contagem de bactérias heterotróficas Cultiváveis**

Para as análises foram pesados 25 gramas das amostras e homogeneizadas em 225 mL de solução salina 0,85%, correspondendo a diluição  $10^{-1}$ , e posteriormente, foram realizadas as demais diluições até  $10^{-6}$ . Para a contagem dos micro-organismos foi utilizada á inoculo em profundidade, onde foi adicionada alíquota de 1 ml em placas de Petri e adicionado o meio fundido *Plate Count Agar* PCA, (Acumedia®). Após a solidificação do meio, as placas foram

incubadas por 24 a 48 h a 35°C. Para a leitura das placas foram escolhidas as aquelas que apresentavam entre 30 a 300 colônias. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g). Todas as amostras foram realizadas em duplicata (SILVA et al., 2010).

### **2.1.2 Determinação do grupo coliforme**

A determinação do Número Mais Provável (NMP/g) de coliformes a 45°C ou termotolerantes foi realizada usando a técnica de fermentação de tubos múltiplos, em três etapas distintas: prova presuntiva, prova confirmatória e prova bioquímica, conforme descrito por SILVA et al. (2010).

Das diluições seriadas, na prova presuntiva alíquotas de 1 mL foram inoculadas em Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) (Himedia®) contendo tubos de *Durhan* invertidos e incubados por 48 h a 35°C. A positividade do teste foi verificada por meio da formação de gás nos tubos de *Durhan* e turvação do meio. Após esse período um inóculo dos tubos positivos foi transferido para tubos contendo caldo *Eschericia coli* (EC) (Acumedia®) e incubados a 45°C em banho-maria por 24 h. A positividade da prova foi verificada por meio da turvação do meio e formação de gás nos tubos de *Durhan*. Os resultados positivos de cada série foram anotados, para posterior consulta à tabela de Hoskins adaptada pelo *Bacteriological Analytical Manual* - BAM (1984).

Decorrido esse período os tubos positivos de EC foram semeados em meio Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) (Himedia®) e incubados a 35°C por 24 h. As colônias características de *E. coli*, isto é, com diâmetro de 2 a 5 mm, centro negro, com ou sem brilho metálico esverdeado foram isoladas em tubos de ensaio contendo Agar Triptona Soja (TSA) (Himedia®) e incubados a 35°C por 24 h. A identificação bioquímica das cepas foi realizada por meio dos testes do IMViC (indol, vermelho de metila, Voges-Proskauer e citrato de Simmons) (FENG et al., 2001).

### **2.1.3. Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva***

A contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* foi realizada por meio da semeadura de alíquotas em superfície no meio seletivo agar Baird-Park (Acumedia®) incubado por 48 horas a 35°C. Para a contagem presuntiva foram

selecionadas as placas contendo entre 20 a 200 colônias, ou seja, colônias negras, circulares, brilhantes, pequenas, lisas, convexas, com bordas perfeitas e rodeadas por uma zona opaca e/ou halo transparente. As colônias atípicas, porém suspeitas, também foram contadas. As colônias típicas foram isoladas em TSA, crescidos e as culturas foram submetidas aos teste de catalase e coagulase.

Para o teste de coagulase pegou se 1 alíquota da cultura crescida a partir da colônia isolada, foram inoculadas em tubos contendo 2 mL de caldo infusão cérebro coração (BHI) (Acumedia®) e incubadas a 35°C por 24 h. Em seguida, 0,2 mL da cultura foi transferido para tubos de ensaio (10 x 100 mm) estéreis e adicionado 0,5 mL de plasma de coelho com EDTA. Os tubos foram homogeneizados com movimentos leves e encubados a 35°C em um intervalo de seis horas a fim de se verificar a formação ou não de coágulos. Para o teste de catalase, foi adicionado uma gota de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), em uma alçada do inóculo e verificado a produção de gás, ou seja, produção de efervescência indica a conversão do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e oxigênio gasoso (SILVA et al., 2010).

#### **2.1.4 Pesquisa de *Salmonella***

Foram pesados 25 gramas das amostras e adicionadas em 225 mL de caldo lactosado (Difco®) e incubados a 35°C por 24 h. Decorrido esse período alíquotas de 1 mL e 0,1 mL foram inoculadas em 10 mL de caldo tetrionato (TT), (Acumedia®) e caldo Rappaport (RV) (Acumedia®), respectivamente. Os tubos foram incubados por 24 h a 37°C. Após esse período, uma alíquota de cada tubo foi retirada e estriada em placas de Petri contendo os meios seletivos agar XLD (Acumedia®) e *Salmonella Shiguela* (SS) (Himedia®). As placas foram incubadas por 24 h a 35°C. As colônias com crescimento característico de *Salmonella* nos meios XLD (colônias rosa escuros com centro negro e uma zona avermelhada levemente transparente ao redor) e SS (colônias transparentes com centro negro pela produção de H<sub>2</sub>S) os isolados foram inoculados em agar triptona soja (TSA) incubados por 24 h a 35°C, e posteriormente submetidos aos testes bioquímicos. Foram inoculadas em agar ferro açúcar triplo (TSI), (Difco®) e agar lisina Ferro (LIA) (Himedia®) e incubados por 24 h a 35°C.

A partir do crescimento positivo nos tubos (ácido na base e alcalino no ápice para o TSI e alcalino com ou sem produção de H<sub>2</sub>S para o LIA) (urease, indol, vermelho de metila, Voges-Proskauer, citrato, descarboxilação da lisina e fermentação de dulcitol, sacarose e lactose) e soroaglutinação rápida, utilizando os soros polivalente somático marcar Probarc Brasil, e flagelar para a confirmação do gênero (SILVA et al., 2010).

## **2.2 Suscetibilidade antimicrobiana**

A suscetibilidade aos antimicrobianos foi avaliada pela técnica de difusão de discos em placas seguindo a metodologia proposta pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010). Os antimicrobianos testados foram: ampicilina (10mg), ceftazidima (30mg), tetraciclina (30mg), gentamicina (10mg) e ciprofloxacina (30mg). Das culturas crescidas em agar TSA (Himedia®) uma alçada foi transferida para tubos de ensaio contendo 9 ml de solução salina (0,85%) até que a densidade bacteriana lida em espectrofotômetro (Sp 1105, Spectrum) no comprimento de onda de 625 nm se encontrasse no intervalo de 0,08 a 0,10 (10<sup>8</sup> UFC/mL) (CLSI, 2010).

Após o ajuste, o inóculo foi espalhado no meio ágar Mueller-Hinton (Himedia®) e adicionado os discos marcas (Laborclin) de antimicrobianos. Antes da aplicação dos discos de antimicrobianos a tampa da placa foi deixada entreaberta por três a cinco minutos de modo a permitir que o excesso de umidade fosse absorvido. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Após esse período, os halos de inibição foram medidos com o auxílio de um paquímetro digital (Digimiss®). Para a interpretação dos resultados foram usadas as tabelas do CLSI (2009). Como controle foram utilizadas uma cepas de referência *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

## **2.3 Análise estatística**

### **2.3.1 Metodologia de amostragem**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com esquema fatorial do tipo 5 x 3 com três repetições. Sendo os tratamentos, cinco restaurantes do tipo *self-service* (A, B, C, D, E) e três tipos de saladas (alface, salada crua mista e de maionese).

### 2.3.2 Análise estatística

Após verificada a normalidade e a homogeneidade de variâncias pelos testes de Lilliefors e de Cochran, respectivamente. Os dados foram submetidos aos testes paramétricos de análise de variância e ao teste de Tukey, ambos a 5% de probabilidade.

## 3. RESULTADO E DISCUSSÃO

A contagem média para as mesófilas heterotróficas aeróbias cultiváveis entre as saladas analisadas revelou maior presença na salada de alface ( $1,25 \times 10^8$  UFC/g) no estabelecimento B, a qual diferiu estatisticamente da salada de maionese ( $5,5 \times 10^5$  UFC/g) (Tabela 1). Este mesmo comportamento foi observado em relação ao estabelecimento A. A contagem de bactérias mesófilas presentes nas saladas composta não apresentou diferença significativa entre as demais, mostrando valores médios de  $6,58 \times 10^6$  UFC/g (Tabela 1).

Contagens de bactérias mesófilas acima de  $10^7$  UFC/g indicam exposição à contaminação ambiental, abuso do binômio tempo/temperatura, armazenamento em temperatura inadequada de refrigeração, bem como manipulação excessiva (CARVALHO et al., 2010).

Considerando a presença do grupo de bactérias mesófilas em relação aos estabelecimentos avaliados, observou-se que o estabelecimento C apresentou os menores valores de contagem, os quais foram significativamente divergentes dos estabelecimentos A e B, para alface; e de todos os estabelecimentos para salada composta. Contudo, não houve diferenças entre os estabelecimentos nas comparações para salada de maionese (Tabela1).

Paula et al. (2003) analisando 30 amostras de alface em restaurantes *self-service* em Niterói, RJ, relataram que em 53% das amostras as contagens se encontravam acima de  $10^7$  UFC/g.

Apesar da legislação brasileira não apresentar limites para as bactérias mesófilas em alimentos prontos para o consumo, independente do lugar e similares (BRASIL, 2001), a presença de heterotróficos cultiváveis nas saladas, embora não possa estar associada diretamente com o risco à saúde dos consumidores, a elevada contagem na alface mostra que estas não estavam sendo higienizadas conforme se estabelece a Resolução RDC Nº 216, 16 de

setembro de 2004.

A presença dessa bactéria nos alimentos, podem promover um período curto de exposição e armazenamento, acarretando prejuízo econômico para os comerciantes (PAULA et al., 2003).

Apesar da legislação brasileira não apresentar limites para as bactérias mesófilas em alimentos prontos para o consumo, servidos em restaurantes e similares (BRASIL, 2001), a presença de heterotróficos cultiváveis nas saladas, embora não possa estar associada diretamente com o risco à saúde dos consumidores, a elevada contagem na alface mostra que estas não estão sendo higienizadas conforme se estabelece a Resolução RDC Nº 216, 16 de setembro de 2004 para alimentos, bem como promove um período curto de exposição e armazenamento, acarretando prejuízo econômico para os comerciantes (PAULA et al., 2003).

Para a presença de *Staphylococcus* spp. nas saladas, a contagem média observada variou de  $5,43 \times 10^2$  UFC/g a  $5,60 \times 10^6$  UFC/g. Nas amostras de salada de alface foram encontradas as maiores concentrações, seguida pela salada composta e a salada de maionese. Contudo, não houve diferenças significativas entre estas (Tabela 1).

*Staphylococcus* coagulase positiva não foi detectada nas amostras, o que demonstra que as saladas fornecidas nos estabelecimentos com relação a este bioindicador estavam em conformidade com a legislação vigente, que preconiza um limite de  $10^3$  UFC/g (BRASIL, 2001).

A investigação de *Staphylococcus* coagulase positiva em alimentos faz-se necessária pelo fato de ser uma bactéria capaz de causar surtos de intoxicação alimentar, visto que, em poucas horas, as cepas produzem toxinas termoestáveis responsáveis por casos de toxinfecções (COSTA et al., 2008) e por ser o manipulador o principal reservatório.

**Tabela 1.** Valores médios das contagens microbiológicas das saladas cruas (alface e composta) e de maionese servidas nos restaurantes do tipo *self-service* em Cruz das Almas, Bahia, durante o período de junho de 2012 a março de 2013.

Estab. <sup>1</sup>	Salada de Alface				Salada composta				Salada de maionese			
	Mesófilos (UFC/g)	<i>Staph.</i> <sup>2</sup> (UFC/g)	Colif. <sup>3</sup> (NMP/g)	<i>E. coli</i>	Mesófilos (UFC/g)	<i>Staph.</i> <sup>2</sup> (UFC/g)	Colif. <sup>3</sup> (NMP/g)	<i>E. coli</i>	Mesófilos (UFC/g)	<i>Staph.</i> <sup>2</sup> (UFC/g)	Colif. <sup>3</sup> (NMP/g)	<i>E. coli</i>
A	4,20x10 <sup>7</sup> ABa	1,20x10 <sup>5</sup>	3,80x10 <sup>6</sup> a	P <sup>4</sup>	6,58x10 <sup>6</sup> Aab	5,90x10 <sup>5</sup>	3,06x10 <sup>6</sup> a	A	9,15x10 <sup>5</sup> b	5,43x10 <sup>2</sup>	3,06x10 <sup>2</sup> b	A
B	1,25x10 <sup>8</sup> Aa	2,43x10 <sup>6</sup>	5,24x10 <sup>4</sup> a	P	4,04x10 <sup>7</sup> Aab	2,64x10 <sup>4</sup>	3,10x10 <sup>5</sup> a	P	5,50x10 <sup>5</sup> b	3,92x10 <sup>3</sup>	< 3,0	A
C	3,20x10 <sup>6</sup> B	5,60x10 <sup>6</sup>	3,13x10 <sup>5</sup> a	P	3,70x10 <sup>4</sup> B	8,90x10 <sup>5</sup>	3,17x10 <sup>4</sup> a	P	5,33x10 <sup>5</sup>	9,53x10 <sup>5</sup>	3,10x10 <sup>4</sup> b	A
D	3,50x10 <sup>7</sup> AB	1,21x10 <sup>5</sup>	3,10x10 <sup>5</sup> a	A <sup>5</sup>	7,13x10 <sup>6</sup> A	6,10x10 <sup>3</sup>	4,14x10 <sup>4</sup> a	A	1,10x10 <sup>7</sup>	6,85x10 <sup>5</sup>	3,10x10 <sup>3</sup> b	A
E	1,51x10 <sup>7</sup> AB	2,13x10 <sup>5</sup>	2,06x10 <sup>3</sup> a	A	8,38x10 <sup>7</sup> A	3,96x10 <sup>3</sup>	3,06x10 <sup>5</sup> a	A	4,18x10 <sup>6</sup>	9,0x10	< 3,0	A
Limite <sup>5</sup>	-	-	10 <sup>2</sup>	-	-	-	10 <sup>2</sup>	-	-	-	10 <sup>2</sup>	-

Período de amostragem: junho/2012 a março/2013; <sup>1</sup>A, B, C, D e E correspondem aos restaurantes avaliados; <sup>2</sup>*Staphylococcus* sp.; <sup>3</sup>Coliformes a 45°C; <sup>4</sup>Presença de células; <sup>5</sup>Ausência de células <sup>5</sup>Limites estabelecidos de acordo com Brasil (2001); Médias seguidas pela mesma letra maiúscula ou minúscula não diferem entre si para p<0,05 na coluna (entre restaurantes) e na linha (entre tipos de saladas), respectivamente.

Corroborando com os resultados, Mogharbel (2007) avaliando a qualidade microbiológica de 66 amostras de alfaces coletadas em lanchonetes antes da lavagem, também não detectaram a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva. Resultados contrários foram citados por Junqueira et al. (2009), ao analisarem 31 amostras de saladas em restaurantes do Rio de Janeiro, RJ, e verificarem a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva acima de  $10^3$  UFC/g em 32,2% das amostras. Bricio et al. (2005), também relataram a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em 27,4% das amostras de salpicão de frango e em 19,3% da salada de maionese em rede de restaurantes também no Rio de Janeiro-RJ.

O número médio determinado a partir da técnica do NMP para os coliformes a 45°C variou de  $< 3,0$  a  $9,2 \times 10^6$  NMP/100g. A partir da verificação estatística, constatou-se que a salada de maionese diferiu, significativamente, das saladas composta e de alface, as quais apresentaram alta contaminação por coliformes a 45°C. Embora tenha se confirmado diferença significativa entre as saladas de maionese dos estabelecimentos A, C e D, em relação às demais saladas, os valores de contagem encontrados nesta foram da ordem  $10^2$  ou superiores (Tabela 1), ou seja, todas as amostras avaliadas (tipos de saladas e estabelecimentos) se encontram fora dos padrões aceitáveis, por apresentarem uma carga de coliformes a 45°C superior a  $10^2$  NMP/g (BRASIL, 2001).

A presença de coliformes a 45°C pode ocorrer por diversos fatores, matéria-prima de má qualidade, manipuladores de alimentos, falhas no processo de higienização bem como contaminação cruzada, na qual os utensílios e superfícies entram em contato com o alimento durante o seu preparo (COSTA et al., 2008).

Rodrigues et al. (2008) avaliando saladas em restaurantes do tipo *self-service* em Lavras, MG, relataram que das 30 amostras analisadas a contagem de coliformes a 45°C se apresentou em torno de  $2,4 \times 10^4$  NMP/g. Segundo os autores a contaminação era decorrente da cozinha dos restaurantes, devido à má higienização das hortaliças, falta de conhecimentos básicos de higiene pelos manipuladores, uso de equipamentos e utensílios mal higienizados e uso de água contaminada.

Guerra e Miguel (2012) analisando 15 amostras de vegetais preparados com molho de maionese, em restaurantes de Urbelândia, MG, não relataram a ocorrência de coliformes a 45°C. Enquanto Brício et al. (2005), ao investigarem pratos à base de maionese caseira, relataram a contaminação por coliformes a 45°C nas saladas de maionese (33,4%) e no salpicão (8,25%). Esse resultado foi atribuído à falha na preparação da maionese e conservação em temperatura inadequada.

Do total de amostras analisadas em Cruz das Almas, *Escherichia coli* (indicadora real de contaminação de origem fecal) foi detectada em apenas 11,11% (5/45) compreendendo, salada de alface (6,6%) e salada composta (4,51%). Também foram isoladas cepas de *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Proteus*.

Apesar dos coliformes a 45°C na legislação de alimentos (BRASIL, 2001) indicarem contaminação de origem fecal, a presença de *Klebsiella* e *Enterobacter* não indica necessariamente contaminação fecal, visto que também são encontrados em vegetais e solo, persistindo por um tempo superior ao das bactérias patogênicas de origem intestinal (AZEREDO, CONCEIÇÃO, STMAFORD, 2004). Este fato demonstra mais uma vez que os legumes e hortaliças servidos nos restaurantes *self-service* de Cruz das Almas, não foram higienizados corretamente ou que a falta de qualificação por parte dos manipuladores de alimentos contribuem contaminação cruzada durante o seu preparo.

*Salmonella* spp. não foi detectada em nenhuma das amostras de saladas, também estando em conformidade com a legislação de alimentos que estabelece ausência em 25 gramas do alimento (BRASIL, 2001). Devido a patogenicidade das bactérias desse gênero a sua detecção é de extrema importância, visto que as infecções causadas por estas bactérias são consideradas como a principal causa de DVAs (SANTANA et al., 2010).

Estes resultados são semelhantes os dados de Calial et al. (2013), ao relatarem ausência de *Salmonella* sp. em 100% das amostras de saladas servidas em restaurantes do tipo *self-service*, situados no município de São Bernardo do Campo, SP. Embora Palú et al. (2002) reportaram a presença de *Salmonella* spp. em amostras de frutas e hortaliças frescas servidas em dois restaurantes *self-service* da Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ.

Seixa et al. (2009) também descreveram a presença de *Salmonella* spp. em 66,7% das saladas enriquecidas com maionese e comercializadas no município de São José do Rio Preto, SP.

O perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cinco cepas de *E. coli* isoladas mostrou que nenhuma delas apresentou resistência antimicrobiana aos diferentes fármacos testados. Este fato é relevante, visto que a presença de genes de resistência móveis entre os patógenos microbianos promove a transmissão e a propagação da resistência aos fármacos usualmente utilizados na terapia humana (SÃO JOSÉ, VANETTI, 2012). Segundo Keeratipul, Phewpan, Lursina, (2011) o uso de esterco na adubação das hortaliças pode promover a veiculação de estirpes resistentes nesses alimentos, que muitas vezes são consumidos crus e sem uma higienização adequada.

Meyer et al. (2008) na Alemanha analisando cepas de *E. coli* isoladas de alimentos, animais e humanos, relataram que as cepas isoladas de animais e alimentos apresentaram maior percentual de resistência à tetraciclina do que as *E. coli* isoladas de humanos. Ainda no mesmo estudo, a ampicilina assumiu o segundo lugar em número de cepas resistentes isoladas de fontes alimentares, ao que autor atribui a resistência a uso de antibióticos para profilaxia veterinária, ou aos tratamentos nos quais os antibióticos são colocados na água ou na ração dos animais.

Palú et al. (2000) avaliando o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de *E. coli* isoladas de frutas e hortaliças servidas em restaurantes no Rio de Janeiro relataram que 91% dos isolados apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados, ao contrário dos resultados encontrada neste trabalho. Nascimento et al. (2003) ao investigarem a sensibilidade de cepas de enterobactérias isoladas em amostras de alface no comércio de São Luis-MA também relataram elevada multirresistência à maioria dos antimicrobianos testados.

#### **4. CONCLUSÃO**

A elevada carga microbiana por heterotróficos cultiváveis, *Staphylococcus* spp. e coliformes a 45°C encontradas nos estabelecimentos avaliados, mostra que as saladas cruas e cozidas servidas em restaurantes *self service* em Cruz

das Almas, não passam por uma higienização adequada ou sofrem contaminação cruzada durante o seu preparo. A contaminação pode ocorrer em diversas etapas de preparo das refeições, por isso, torna-se importante a adoção de boas práticas de higiene nos restaurantes avaliados. Apesar da falta de inocuidade das saladas, não há veiculação de bactérias com resistência antimicrobiana.

## 5. REFERÊNCIAS

ARAUJO, M. S.; RODRIGUES, M. S. A.; SILVAR, A, S.; MARTINS, W. F.; ARAUJO, A. S. Análise microbiológica de saladas servidas em restaurantes da cidade de Pombal – PB. **Caderno Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Campina Grande, v.1, n.1, p.1, 2011.

AKUTSUR. C.; BOTELHO, R. A.; CAMARGO, E. B.; SAVIO, K. E. O.; ARAUJO, W. C. Adequação das boas pratica de fabricação em serviços de alimentação. **Revista de Nutrição**, Campinas, v., 18, n.3, p.419-427 ,2005.

ALVES, M. G.; UENO, M. Restaurantes *self-service*: Segurança e Qualidade Sanitária dos Alimentos Servidos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 573-580, 2010.

AZEREDO, G. A.; CONCEIÇÃO, M. L.; STMAFORD, T. L. M. Qualidade higiênicosanitária das refeições em um restaurante universitário. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.18, n.125, p.74-78, 2004.

ALVES, M. G.; UENO, M. Restaurantes Self-Service: Segurança E Qualidade Sanitária dos Alimentos Servidos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 573-580. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº216, de 15 de Setembro de 2004. **Aprova o Regulamento Técnico De Boas Práticas Para Serviços De Alimentação**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/bps.htm> >. Acesso em: 12 jan. 2014.

BRICIO, S. M. L.; LEITE, S. G. F.; VIANA, C. M. Avaliação Microbiológica De Salpicão De Frango E Salada De Maionese Com Ovos Servidos em Restaurantes *Self-Service* na cidade do Rio de Janeiro. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.19, n.137, p.90-95, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC Nº 216 DE 16 DE SETEMBRO DE 2004. Dispõe sobre regulamento técnico de Boas Práticas para serviços de alimentação, **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 – 2008**. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos\\_dta\\_15.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf) Acesso em: 26 ago. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasil, n.7, p. 46-53, 2001.

CALIL, B. M. E.; FERREIRA, A. L. F.; BRAZÃO, S. C.; SOVENHI, C. C. Qualidade microbiológica de saladas oferecidas em restaurantes tipo *self-service*. **Revista Atas da Saúde Ambiental**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 36-42, 2013.

CARVALHO, O. G. P.; RODRIGUES, S. S. E.; ALMEIDA, L. G. C.; FIUEIREDO, N. D. S. R. F.; OLIVEIRA, L. D. A.; COSTA, M. G. J. Análise microbiológica e parasitológica de saladas servidas em *self-service* no município de Crato-Ceara. **Revista Caderno de Cultura e Ciência**, Cariri, v.2, n.2, p. 03-05, 2010.

CARDOSO, G. T.; CARVALHO, M. V. Toxifecção alimentar por *Salmonella Spp*. **Revista Instituto de Ciência e Saúde**, São Paulo, v.24, n.3, p. 95-101, 2006.

CAMPO, S. R. H.; KIPNIS, A.; ANDRÉ, B. D. P.; VIEIRA, S. A.; JAYME, B. L. S.; SANTOS, P. P.; SERAFINI, B. A. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p. 1221-1227, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – 10 states. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, n.59, v.14, p. 418-422, 2010.

CERF, O.; CARPENTIER, B.; SANDERS, P. Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: “Resistance” has different meanings. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 136, n. 3, p. 247-254, 2010.

COSTA, A. A.; SOUZA, J. S. M.; COELHO, A. F. S.; Avaliação microbiológica de saladas de vegetais servidas em restaurantes *self service* na cidade de Palmas, TO. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.22, p. 27-32, 2008.

DIAS, F. P. M.; SILVA, R. F.; CASTRO, D. M., A., Escola como promotora de hábitos alimentares saudáveis no contexto ambiental. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Campus do Vale, v.8, n. 2, p. 07-09, 2013.

EUGÊNIO, A. L. F.; PAULA, G. C. E.; TEIXEIRA, R. B.; DELVIVO, F. M. Análise das condições higiênicas-sanitárias de saladas cruas servidas no restaurantes Popular de Belo Horizonte-MG. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.10 n.18, p. 139-141, 2010.

FAO/OIE/WHO. Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. In: **Report of a joint FAO/OIE/WHO expert consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance**, p. 107, 2008 Disponível em: < [ftp://ftp.fao.org/ag/agn/food/aquaculture\\_rep\\_13\\_16june2006.pdf](ftp://ftp.fao.org/ag/agn/food/aquaculture_rep_13_16june2006.pdf). Acesso em: 24 de fevereiro de 2013

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce (2009)**. Disponível em: <

<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses> >. Acesso em 01 de nov. de 2013.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002, p.424.

FERREIRA, M. G. A. B.; BAYMA, A. B.; MARTINS, A. G. L. A.; GARCIAS, J. A. V.; MARINHO, S. C. Aspectos higiênico - sanitários de legumes e verduras minimamente processados e congelados. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 106, p. 49-55, 2003.

FIGUEIREDO, I.C. R; JAIME, P. C.; MONTEIRO, C. A. Fatores associados ao consumo de frutas, verduras e legumes em adultos na cidade de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, n.42 , v.5, p.777-785, 2008.

KLAIBER, R. G.; S. BAUR, G.; WOL. W. P. Quality of minimally processed carrots as affected by warm water washing and chlorination. **Food Control**, Guildford, v. 35, n. 06, p.362-468, 2005.

KEERATIPIBUL, S.; PHEWPAN, A.; LURSINSA, P. Prediction of coliforms and *Escherichia coli* on tomato fruits and lettuce leaves after sanitizing by using Artificial Neural Networks, **Food Science and Technology**, Zürich, v.44, n. 18, p.130-138, 2011

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Agentes Bacterianos De Toxinfecções. In: **Higiene e Vigilância Sanitária De Alimentos**, 4. ed. São Paulo: Varela, 2001, p.234-238.

GUIMARÃES, A. M.; ALVES, E. G. L.; FIGUEIREDO, H. C. P.; COSTA, G. M.; RODRIGUES, L. S. Frequência de enteroparasitas em amostras de alface (*Lactuca sativa*) comercializadas em Lavras, Minas Gerais. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 5, p. 132-135, 2003.

GUERRA, C. B.; MIGUEL, D.P. *Staphylococcus coagulase* positiva e coliforme fecais em patos frios adicionados de molho de maionese. **Cadernos de Pós-Graduação da FAZU**, Uberaba, v.2, n.3, p. 08-09, 2011.

HAVELEAR, A. H.; BRUL, S.; JONGE, A.; ZWIETERINGR.M. H.; TULIE, B. H. Future challenges to microbial food safety. **International Journal of Food Microbiology**, New Delhi, v.30, n.139, p.79-94, 2010.

JUNQUEIRA, A. R.; FLEMING, L. R.; SAMPAIO, L. S.; NASCIMENTO, J. S. *estafilococos* coagulase positiva em saladas de restaurantes *self-service* da Cidade do Rio de Janeiro. **Revista Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, Rio de Janeiro, v.1, n.1, p. 1-10, 2009.

LYNCH, M.; PAINTER, J.; WOODRUFF, R.; BRANDEN, C. Surveillance for foodborne-disease outbreaks-United States, 1998–2002. **Morbidity Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.55, n.10, p.31-34, 2006.

MEYER, E.; LUNKE, C.; KIST, M.; SCHWAB, F.; FRANK, U. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from food, animals and humans in Germany. **Journal of Infection Control**, Campinas, v. 36, n.01, p. 59-61, 2008.

MENDONÇA, S. C.; CORREIA, R. T. P.; ALBINO, E. Condições Higiênico-Sanitárias de Mercados e Feiras Livres da Cidade de Recife-PE. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 94, p.20-25, 2002.

MOGHARBEL, A. D. I. **Validação do emprego de instrumentos de coleta de dados, alface e manipuladores como indicadores de boas práticas em lanchonetes**. Curitiba: 2007, f.137. Tese (Doutorado), Programa de pós-graduação em tecnologia de alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2007.

NASCIMENTO, R. A.; FILHO, M. E. J.; FILHO, M. E. V.; MARTINS, A. L. G. A. MARINHO, M. E. V.; SERRA, C. L. C.; ALVES, C. M. Avaliação da

sensibilidade de antimicrobianos a cepas enterobacterias isoladas de amostras de alface (*Lactuca sativa*) comercializada na cidade de São Luis–MA. **Boletim Centro de Pesquisa Processo Alimentos**, Curitiba, n.22, v. 14, p 22- 26, 2005.

NASCIMENTO, M. S. Avaliação comparativa de diferentes desinfetantes na sanitização de uva. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.6, n.1, p.63- 68, 2003.

OLIVEIRA, P. G. C.; RODRIGUES, S. E. S.; ALMEIDA. C. G. L.; FIGUEIREDO, F. R.; RODRIGUES, F. F. G.; OLIVEIRA. A. D. L.; COSTA, J. G. M. Análises microbiológicas e parasitológicas de saladas verdes servidas em *self-service* no município de Crato – Ceará. **Caderno de cultura e ciência**, Cariri, v.2, n. 2, p.21-23, 2010.

OLIVEIRA, S. P.; FREITAS, F. V.; MUNIZ, L. B.; PRAZERES, R. Condições higiênicosanitárias do comércio de alimentos no município de Ouro Preto, MG. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.19, n.136, p.26-31, 2003.

PAULA, P.; RODRIGUES, S. S. P.; TÓRTORA, O. C. J.; UCHOA, A. M. C.; FARAGE, S. Contaminação microbiológica e parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa*) de restaurante *self-service*, de Niterói, RJ. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.36, n.4, p.535-537, 2003.

PALÚ, A. P.; TIBANA, A.; TEIXEIRA, L. M.; MIGUEL, M. A. L.; PYRRHO, A. S.; LOPES, H. R. Avaliação microbiológica de frutas e hortaliças frescas servidas em restaurantes *self-service* privados da Universidade Federal do Rio de Janeiro. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.100, p. 67-73, 2002.

PALÚ, A. P.; PYRRO, A. S.; MIGUEL, M. A. L. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e marcadores de agressão da microbiota de frutas e hortaliças servidas em restaurantes do Rio de Janeiro. In: Congresso Brasileiro de

Ciência e Tecnologia de Alimentos, 17. 2000, Fortaleza. **Resumos**. Fortaleza: UFC, p. 4161-4161, 2000.

PEREIRA, A. P. M.; HOFFMANN, F. L. Qualidade microbiológica de vegetais minimamente processados comercializados na cidade de São José do Rio Preto, SP. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.32, n.139, p.60-63, 2011.

QUEIROZ A. T. A.; RODRIGUES, C. R.; ALVAREZ. G. G.; KAKISAKA, L. T. Boas praticas de fabricação de restuarantes por quilo a quilo, divisão de doenças transmissivas hídrica e alimentar. **Revista de Epidemiologia das Doenças Transmitidas por Alimentos** (online), São Paulo, v.1, n.1, p. 16-18, 2001.

RODRIGUES, C. S.; JUNQUEIRA, A. A.; GRAVINA, C. S. Presença de coliformes fecais em saladas de alface e tomate em restaurantes do tipo “self-service” em Brasília-DF. **Revista Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p.1452-S1455, 2008.

RIBEIRO, L. L.; CARVALHO, E. P.; PILON, L. Análise De Perigos E Pontos Críticos De Controle No Preparo A Base De Creme De Maionese Caseiro, Em Restaurantes Self-Services. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n. 68-69, p. 93-100, 2000.

SALEZ, L.; MALO, D. Protagonists of innate immunity during in *Salmonella* infections. **Revista Medecine Sciences**, Canadá, v. 20, n.10, p.1119-1124, 2004.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI,V.; ARANGO-ALEGRO, L. C.; MENDOÇA, M. B. O. C. *Estafilococos* em alimento: Uma revisão. **Revista Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v.77, n.3, p. 545-554, 2010.

TAVARES, T.; ARAÚJO, A. L. U. S.; UENO M. Patógenos veiculados por saladas de alface servidas em restaurantes. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 23, n. 172/173, p. 136-141, 2009.

SEIXA, R. F.; GONÇALVES, T.; M. V.; HOFFMANH, L. Verificação da qualidade microbiológica de saladas adicionadas de maionese comercializadas no município São José do Rio Preto, SP. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.23, n. 20, p142-149, 2009.

SÃO JOSÉ, J. F. B.; VANETTI, M .C .D. Effect of ultrasound and commercial sanitizers on natural microbiota and *Salmonella enterica* Typhimurium on cherry tomatoes. **Food Control**, Guildford, v.24, n.1-2, p.95-99, 2012.

SOUZA, S. S.; PELICIONI, M. C. F.; PEREIRA, I. M. T. B. A vigilância sanitária de alimentos como instrumentos de promoção a saúde. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n.113, p33-37, 2003.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M. Prevalência de *Salmonella enteritidis* em carcaças de frango industrialmente processadas. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 107, p. 52-55, 2003.

VIEIRA, R. H. S. F.; ATAYDE, M. A.; CARVALHO, R. M.; CARVALHO, T. C.; FONTELE, S. F.A. Contaminação fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* e da água de cultivo do estuário do Rio Pacoti (Eusébio, Estado do Ceará): Isolamento e identificação de *Escherichia coli* e sua susceptibilidade a diferentes antimicrobianos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 180-189, 2008.

ZOLI, J. A.; OLIVEIRA, N. I. A.; MOREIRA, R. C. T. Avaliação da contaminação por *Staphylococcus aureus* e *Salmonella spp.* de maionese de batata comercializada em Londrina, PR. **Revista Higiene alimentar**, São Paulo, v.16, n. 95, p.62-71, 2002.

WANG, J.; MEMBRÉ, J; SANG-DO, H.; BAHK, G.; CHUNG, H.; HWANG, I.;  
Modeling the Combined Effect of Temperature and Relative Humidity on  
Escherichia coli O157:H7 on Lettuce. **Magazine Food Science and  
Biotechnology**, Korea, v.21, n.3, p. 859-865, 2012.

---

## **CAPÍTULO 3**

### **Eficiência de diferentes marcas de água sanitária na higienização de alfaces**

---

## **Eficiência de diferentes marcas de água sanitária na higienização de alfaces**

Marly Silveira Santos<sup>1\*</sup>, Norma Suely Evangelista-Barreto<sup>2</sup>, Fernanda de Souza Bernandes<sup>3</sup>, Camila de Souza Carneiro<sup>4</sup>, Fabio oliveira Santos<sup>5</sup>

---

<sup>1</sup>Discente do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - CCAAB, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB.

<sup>2</sup>Professor adjunto, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - CCAAB, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB.

<sup>3</sup>Bolsita PND, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - CCAAB, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB.

<sup>4</sup>Discente do curso de Biologia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - CCAAB, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB.

<sup>5</sup>Professor adjunto, Centro de Ciências da Saúde - CSS, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB.

\*Autora para correspondência: marly.nutr@hotmail.com

### **RESUMO**

Dentre as hortaliças cruas consumidas pela população brasileira a alface (*Lactuca sativa* L.), se destaca por possuir valores nutricionais, sendo rica em vitaminas e minerais, além de auxiliar na perda de peso. No processo de higienização das hortaliças, o saneante mais utilizado e recomendado pela legislação brasileira é o hipoclorito de sódio, que contribui para inocuidade do alimento, reduzindo os patógenos relacionados às Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs). Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de três marcas de água sanitária comercializadas nos supermercados de Cruz das Almas, Bahia, Brasil. O teste foi realizado em triplicata com as diferentes águas sanitárias identificadas como, SA, SB e SC. Os tratamentos foram compostos por: T1(1colher de sopa/8 mL de água sanitária), T2 (2 colheres de sopa/16 mL de água sanitária), T3 (3 colheres/24 ml de água sanitária) e os tratamentos T4 (1 colher de sopa/8mL de água sanitária fornecida pelo Ministério da Saúde) para os tratamentos usou 1000mL de água e T5 (sem a adição de água sanitária), como tratamentos

controles. Além de verificar a eficácia das águas sanitárias no controle dos micro-organismos, também se determinou o teor de cloro ativo presentes nas águas sanitárias comerciais, a partir da constatação de sua quantidade em ppm/volume utilizado. Após a imersão da alface na água clorada por 15 minutos foi quantificada a presença de bactérias heterotróficas cultiváveis e de coliformes a 45°C. A carga microbiana no tratamento controle (sem adição de água sanitária) foi de 5,7 UFC/g a 7,34 UFC/g para as bactérias heterotróficas cultiváveis e de 5,3 NMP/g a 4,57 NMP/g para coliformes a 45°C. Tanto para os mesófilos, quanto para os coliformes a 45°C, a maior redução da carga microbiana ocorreu com a água sanitária SA, no tratamento T1. Já para os tratamentos T2 e T3 houve a eliminação total dos coliformes a 45°C e a redução a níveis aceitáveis em torno de log (5 UFC/g) para mesófilos. No tratamento T4, houve redução para todas as bactérias analisadas. Quanto à concentração de cloro ativo foi encontrado 2,5% para marca SA e 2,0% para as marcas SB e SC. Para o valor em mg/L os tratamento T1 na marca SA estava dentro do recomendado pela legislação ( 200 mg/L). Das três águas sanitárias utilizadas apenas a marca SA foi eficiente na redução de coliformes a 45°C, entretanto, não reduziu a níveis aceitáveis, segundo a norma RDC 12/2001. Todas as marcas se encontravam dentro do intervalo de cloro ativo preconizado pela legislação. Os tratamentos T1 (marca SA) alcançou a concentração de mg/L estipulada pela legislação brasileira. As águas sanitárias a base de hipoclorito de sódio comercializadas nos supermercados a depender da marca não alcança níveis de eficiência aceitáveis para os coliformes a 45°C quando usado na concentração estipulada pelo ministério da saúde, ou seja, 1 colher de sopa.

**Palavras-chave:** alface, cloro ativo, coliformes, higienização.

## ABSTRACT

### EFFICIENCY OF DIFFERENT BRANDS OF BLEACH IN THE SANITIZING OF LETTUCE

Among the raw vegetables consumed by the Brazilian population lettuce (*Lactuca sativa* L.) stands out due to nutritional values, rich in vitamins and minerals and help in weight loss. In the process sanitizing the vegetables, the most used and recommended by Brazilian legislation saneante is sodium hypochlorite. This contributes to food safety by reducing pathogens related to diseases transmitted by food (DVAS). Thus, the present study aimed to evaluate the efficiency of three brands of bleach sold in supermarkets Cruz das Almas, Bahia. The test was performed in triplicate with different bleaches identified as SA, SB and SC. The treatments were: T1 (8 ml of bleach), T2 (16 ml of bleach), T3 (24 ml of bleach) and T4 (8ml bleach provided by the Ministry of Health). All treatments were diluted into 1000 mL of water and the treatment T5 (without added bleach) as a control treatment. In addition to checking the effectiveness of sanitary water in the control of micro-organisms, also determined the content of active chlorine present in commercial bleaches by noting their quantity in ppm / volume used. After immersion in chlorinated water of lettuce for 15 minutes was quantified presence of mesophilic aerobic heterotrophic bacteria and coliforms 45°C. The microbial load in the control treatment (no added bleach) was 5.7 CFU/g to 7.34 CFU/g for mesophilic aerobic bacteria cultivable and 5.3 MPN/g to 4.57 MPN/g for coliforms at 45°C. Both mesophilic and for coliforms at 45 ° C the largest reduction of microbial load occurred with bleach SA, in treatment T1. The T2 and T3 promoted the total elimination of coliforms at 45°C and the reduction to acceptable levels of mesophilic (log 5 CFU/g). In treatment T4 there was a reduction of all bacteria examined. The chlorine concentration assets in SA brand was 2.5% and 2.0% for SB and SC marks. Only the T1 treatment of SA brand was in accordance with the legislation recommended (200 mg/L). The three bleaches used only brand SA was effective in reducing coliforms bacteria at 45°C. However, not reduced to acceptable levels, according with the legislation RDC 12/2001. All brands were within the range of active chlorine recommended by law. The treatments T1 (SA brand) reached the concentration of mg/L stipulated by

Brazilian law. The study found that some brands of bleach-based sodium hypochlorite do not reach acceptable levels of efficiency to control coliforms at 45°C when used in concentrations stipulated by the Ministry of Health (8 mL).

**Key words:** Lettuce, active chlorine, coliforms, sanitization.

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre os alimentos frescos largamente consumidos pela população brasileira as hortaliças se enquadram em um grupo de risco, uma vez que possuem uma elevada carga microbiana em sua microbiota natural (BERBARI, PASCHOALINO, SILVEIRA, 2001). A contaminação das hortaliças ocorre pelo uso de adubos orgânicos, utilização de águas contaminadas durante a irrigação (KEERATIPIBUL, PHEWPAN, LURSINSAP, 2011) e falhas higiênicos-sanitárias durante o seu preparo (PACHECO et al., 2002).

Contaminantes microbiológicos como as bactérias mesófilas e o grupo dos coliformes presentes nas hortaliças são bioindicadores da qualidade sanitária desses alimentos (FAO, 2008). Devido à sua presença em grande quantidade nas fezes, principalmente em adubos orgânicos, os coliformes a 45°C tem sido utilizados como indicador de poluição de origem fecal (SILVA et al., 2010).

Dentre as hortaliças mais comercializadas e consumidas cruas, a alface (*Lactuca sativa* L.) é a mais utilizada, principalmente em preparações de sanduíches, decoração de pratos de saladas e sucos desintoxicantes (BERBARI, PASCHOALINO, SILVEIRA, 2001). A preferência pelo consumo da alface se deve ao sabor agradável e refrescante, rica em sais minerais, vitaminas e ainda apresentar efeito calmante, diurético e laxante (MARINO, TEIXEIA, OKURA, 2005).

A elevada carga microbiana nas hortaliças pode ser reduzida ou eliminada com higienização adequada, garantindo a inocuidade do alimento. Nesse sentido, os compostos clorados têm se destacado, devido à sua eficiência na eliminação e redução da carga microbiana dos alimentos. O cloro, especialmente na forma de sal de hipoclorito, é empregado para o controle bacteriológico em indústrias de frutas e hortaliças. Fatores como a concentração de cloro ativo na solução e o tempo de ação do sanitizante são

determinantes para a eficácia do efeito antimicrobiano do produto (BRUNO; PINTO, 2004).

Segundo a Resolução – RDC nº 55, 13 de novembro de 2009 (BRASIL, 2009) o cloro a uma concentração de 2,5% é um dos sanitizantes aceitos pela legislação brasileira. O baixo custo e a sua fácil aquisição fazem com que este produto seja amplamente utilizado pela população (LÓPEZ-GÁLVEZ et al., 2010). Entretanto, a eficiência dos saneantes depende da natureza do alimento, da microbiota contaminante, do tempo de ação, da concentração e o período de contato com o alimento (ANDRADE, 2008). Tanto no âmbito doméstico como em estabelecimentos que oferecem alimentação coletiva, a água sanitária é utilizada na higienização das hortaliças e legumes. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de três marcas de água sanitária comercializadas nos supermercados de Cruz das Almas, Bahia; assim como verificar o teor de cloro ativo nas mesmas.

## **2. MATERIAL E METODOS**

### **2.1. Coleta e obtenção das amostras**

Foram escolhidas três marcas de água sanitária comumente encontradas nos supermercados de Cruz das Almas, Bahia, Brasil. A identificação dos produtos foi reservada apenas para o executor da pesquisa e identificados pelas letras SA, SB e SC.

As amostras de alface de cultivo tradicional foram adquiridas em supermercado na própria embalagem fornecida pelo estabelecimento e imediatamente encaminhada ao laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental - LABMAA para as análises.

No laboratório, uma parte da alface foi submetida ao tratamento com a água sanitária (SA, SB e SC) nos tratamentos T1 (1 colher de sopa de água sanitária, que corresponde a 8 mL), T2 (2 colheres de sopa de água sanitária, que corresponde a 16mL), T3 (3 colheres de sopa de água sanitária, que corresponde a 24mL), o tratamento T4 foi usado com uma solução de hipoclorito de sódio a 2,5% fornecido pelo Ministério da Saúde nos postos de distribuição, na mesma quantidade preconizada na Resolução- RDC nº 216, ou

seja ou , (1 colher de sopa ou 8 mL em um litro de água), para todos os tratamentos utilizou-se 1 litro de água. Para o controle não houve adição de não houve a adição do hipoclorito de sódio (T5). Tanto as águas sanitárias comerciais como a amostra do Ministério da Saúde, possuem como composição descrita na rotulagem Hipoclorito de sódio variando de 2,0% a 2,5%.

Inicialmente, as folhas de alface foram lavadas em água mineral, picadas com uma faca esterilizada e emergidas na solução clorada por 15 minutos (BRASIL, 2002). Buscou-se simular o que é feito no âmbito doméstico. Decorrido esse período, a alface foi retirada da solução, lavada em água mineral e submetida às análises microbiológicas. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata. Além de estimar a carga microbiana, foi realizado a mensuração do teor de cloro ativo, com o objetivo de verificar se as marcas analisadas estavam de acordo com intervalo da concentração de 2,0 a 2,5% de cloro ativo, que é preconizada pela legislação brasileira (BRASIL, 2009).

## 2.2 Análises microbiológicas

Para a análise de bactérias heterotróficas mesófilas aeróbias cultiváveis foi pesado 25 gramas da amostra macerada e adicionada em 225 mL de solução salina a 0,85%, que correspondia a diluição inicial ( $10^{-1}$ ). Em seguida, foram realizadas as demais diluições decimais até  $10^{-6}$ . Para a contagem das bactérias mesófilas aeróbias foi utilizada a técnica em profundidade no meio *Plate Count Agar* – PCA (Acumedia®) em duplicata. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas por 24 a 48h, a 35°C. Para a leitura das placas, foram escolhidas as placas que apresentaram entre 30 a 300 colônias. Os resultados foram expressos Log/ das Unidades Formadores de Colônias (UFC/g) (SILVA et al., 2010).

A determinação do Número Mais Provável (NMP/g) de coliformes a 45°C foi realizada usando a técnica de fermentação em tubos múltiplos em série de três tubos. Na prova presuntiva alíquotas de 1 mL foram inoculadas em Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) (Himidea®) contendo tubos de *Durham* invertidos e incubados por 48 h a 35°C. A positividade do teste foi verificada por meio da formação de gás nos tubos de *Durham* e turvação do meio. Após esse período

uma alíquota dos tubos positivos foi transferida para tubos contendo caldo *Escherichia coli* (EC) (Acumedia®) e incubados a 45°C em banho-maria por 24 h. A positividade da prova é semelhante para o descrito para o caldo LST. O resultado positivo de cada série foi anotado para posterior consulta à tabela de Hoskins adaptada pelo *Bacteriological Analytical Manual* - BAM (1984).

Decorrido esse período os tubos positivos de EC foram semeados em meio Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) (Himedia®) e incubados a 35°C por 24 h. As colônias características de *E. coli*, isto é, com diâmetro de 2 a 5 mm, centro negro, com ou sem brilho metálico esverdeado foram isoladas em tubos de ensaio contendo Agar Triptona Soja (TSA) (Himedia®) e incubados a 35°C por 24 h. A identificação bioquímica das cepas foi realizada por meio dos testes do IMViC (indol, vermelho de metila, Voges-Proskauer e citrato de Simmons) (FENG et al., 2001).

### 2.3 Análise Química

Para mesurar a quantidade de cloro ativo nas três marcas de águas sanitárias utilizadas para o teste de eficiência, adicionou aproximadamente 100 mL de água destilada em um *Erlenmeyer* de 250 mL, posteriormente, se adicionou 1,00 mL de solução amostra de hipoclorito comercial em seguida, adicionou cerca de 10 mL da solução 10% de KI(Iodeto de potássio) e 20 mL de ácido acético, dando início a titulação com tiosulfato padronizado. Próximo ao ponto final, adicionou cerca de 5 mL de suspensão de amido e prosseguir a titulação até o desaparecimento da coloração azul, anotando neste momento o volume de tiosulfato empregado com exatidão. O experimento foi repetido duas vezes. A partir dos valores do cloro ativo foram calculado o valor em mg/L de cada tratamento (ZENEON, PASCUET,2005).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das contagens bacterianas, observou-se que o saneante SA no Tratamento T1, reduziu a carga bacteriana mesofílica, sendo o mais eficiente quando comparado às marcas SB e SC (Tabela 1). Quanto aos coliformes a 45°C, este tratamento reduziu 2 ciclos logarítmicos em relação ao controle.

Quando comparado aos saneantes SB e SC, essa redução foi de 1 ciclo logarítmico (Tabela 1).

Apesar da eficiência do saneante SA, este não alcançou o valor determinado pela Resolução RDC N°12 de 2001, que preconiza a contagem de coliformes a 45°C até log 2,0 ou 10<sup>2</sup> UFC/g, em hortaliças, legumes e similares frescos, *in natura*, reparados (descascados, selecionados ou fracionados), sanificados, refrigerados ou congelados (BRASIL, 2001).

Santos et al. (2012), testando a eficiência da água sanitária em diferentes intervalos de tempo (0,15,30 e 45 minutos), na sanitização de alface observaram uma redução 3 ciclos logaritmos de coliformes a 45°C em todos os intervalos testados, embora sem alcançar valores que atendessem a normatização, de 2 log ou 10<sup>2</sup> NMP/g corroborando com o presente trabalho.

Para o Tratamento T2, marca SA, a contagem de mesófilos aeróbios reduziu 2 ciclos logarítmicos em relação ao controle, enquanto, as marcas SB e SC reduziram apenas 1 ciclo logarítmico, semelhante ao ocorrido no tratamento T1. Para os coliformes a 45°C o saneante SA promoveu 100% de redução, enquanto, as marcas SB e SC reduziram 3 ciclos logarítmicos, sem, no entanto, atingir o padrão preconizado pela Resolução No. 12 (BRASIL, 2001) (Tabela 1).

No Tratamento T3, todas as marcas de água sanitária (SA, SB e SC) reduziram a contagem de mesófilos em 4 ciclos logarítmicos não sendo detectados a presença de coliformes a 45°C (Tabela 1).

O Tratamento T4 (Hipoclorito de sódio fornecido pelo Ministério da Saúde) reduziu a presença de mesófilos em comparação aos demais tratamentos, assim como de coliformes a 45°C. Contudo, esta redução não atingiu o padrão estabelecido na legislação de alimentos (BRASIL, 2001) (Tabela 1). A medida de uma colher de sopa, conforme preconiza o ministério da saúde na higienização de frutas e hortaliças, pode variar entre 8 mL a 10 mL, sugerindo-se que a concentração de 10 mL deve ser suficiente para reduzir a carga microbiana de coliformes a 45°C a níveis aceitáveis.

**Tabela 1.** Média das contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios e coliformes a 45°C nas amostras de alfaces submetidas a quatro tratamentos de higienização usando três diferentes marcas de saneantes a base de hipoclorito de sódio.

Saneantes	T1(8mL)		T2(16mL)		T3(24mL)		T4(8mL)	
	Mesófilos	Coliformes	Mesófilos	Coliformes	Mesófilos	Coliformes	Mesófilos	Coliformes
	UFC/g	a 45°C NMP/g						
Controle(T5)	7,34	4,57	6,9	5,1	7,0	7,0	5,7	5,3
SA	3,17	2,69	4,7	0,0	3,6	0,0	3,5	2,9
SB	5,54	3,11	5,8	2,82	3,7	0,0	-	-
SC	6,65	3,33	5,8	2,83	3,8	0,0	-	-
RDC, nº12 (BRASIL, 2001)	-	2,0	-	2,0	-	2,0	-	2,0

UFC= Unidade Formadora de Colônia NMP = Número Mais Provável.

A legislação brasileira não estabelece limites para bactérias aeróbias mesófilas. Levando em consideração os limites utilizados para bactérias mesófilas aeróbias no Japão, foi definido que o valor de até  $10^5$  UFC/g ou log 5UFC/g), é considerado seguro para o consumo humano (KANEKO et al., 1999).

Oliveira e Figueiredo (2006) relataram que alfaces sem higienização comercializadas em feiras-livres, na cidade de Belém, Pará, apresentaram contagens de bactérias aeróbias mesófilas variando log de 6,0 UFC/g a 7,9 UFC/g. Os vegetais frescos possuem uma população microbiana variável, devido estes apresentarem seus próprios micro-organismos endofíticos e epifíticos, além de outros advindos de outros nichos e/ou ambientes (BRACKETT, SPLITSTOESSER, 2001).

A contagem elevada para coliformes a 45°C pode ser atribuída à água utilizada para a irrigação, sem padrão de potabilidade e o uso de adubos orgânicos obtidos da decomposição de restos de plantas ou de esterco de animais (OLIVEIRA et al., 2013). Outro fator a ser considerado é a produção das hortaliças por pequenos agricultores, no qual utiliza-se poucas técnicas, que favoreça a redução da carga microbiana dos estercos, podendo representar uma fonte de contaminação de micro-organismos proveniente do trato intestinal dos animais (BOLIVAR, SOARES, 2005).

A eficiência do processo de higienização é dependente da qualidade e da carga microbiana inicial da matéria-prima e da qualidade do saneante, visto que quanto menor a carga inicial microbiana no alimento, melhor será a sua higienização (PACHECO et al., 2002). Alguns fatores podem influenciar na eficácia de sanitização do cloro, dentre os quais estão a concentração utilizada, o pH do produto, o tempo de imersão, a temperatura e a quantidade de matéria orgânica presente no alimento (FIGUEREDO, 2013).

López-Gálvez et al. (2010), relataram que a baixa eficiência do hipoclorito pode estar relacionada à localização das células bacterianas, que podem estar protegidas nos estômatos teciduais das folhas de alface, o que talvez dificulte a exposição ao sanitizante. Portanto, apesar de lavadas e sanitizadas com solução de água sanitária, as alfaces poderiam ainda veicular micro-organismos e, dessa forma, representariam um veículo de transmissão de

doenças. Os produtos a base de cloro ativo agem por inibição de algumas reações enzimáticas-chave dentro das células, por desnaturação de proteína e por inativação do ácido nucléico (MOREIRA et al., 2013).

Maistro (2006), analisando 100 amostras de vegetais minimamente processados relatou que após a higienização com hipoclorito de sódio (2,0%), a presença de mesófilos era superior a  $7 \log \text{ UFC/g}^{-1}$  em 45,8% das hortaliças minimamente processadas.

Tavares, Araujo, Ueno (2009), verificando a atividade antimicrobiana de diferentes desinfetantes na sanitização de alfaces comercializadas na cidade de Santa Maria/RS, observou que o hipoclorito de sódio a 2,5%, em um volume de 4 mg/L, se mostrou eficaz na redução de coliformes a 45°C. Esta afirmação é contrária a observada no presente estudo, uma vez que a utilização do dobro do volume (8 mL), no tratamento T1, não houve uma redução a níveis aceitáveis de coliformes a 45°C.

Com relação a determinação do teor de cloro ativo, apenas a marca SA continha 2,5% de concentração de cloro, o que fez com que esta apresentasse maior eficiência quando comparada as demais.

As marcas SB e SC continham apenas 2,0% de cloro ativo, confirmando a informação presente nos rótulos de ambas as marcas, com concentração no intervalo de 2,0% a 2,5%. Segundo a Portaria Nº 89, de 25 de agosto de 1994 (BRASIL, 1994), para ser considerada água sanitária, a mesma deve conter soluções aquosas à base de hipoclorito ou cálcio com teor de cloro ativo de 2,0% a 2,5%. Diante disso, as marcas pesquisadas neste trabalho estão de acordo com a legislação vigente.

A determinação da concentração em mg/L de cloro ativo nos tratamentos, mostrou que o tratamento T1 (8 mL) apresentou valores de 200 mg/L, para marca SA e 160 mg/L para as marcas SB e SC.

Para o tratamento T2 (16 mL) a marca SA, apresentava um valor de 400 mg/L, enquanto as marcas SB e SC 320 mg/L. No tratamento T3 (24 mL) a concentração encontrada para a marca SA, foi de 600 mg/L, enquanto as marcas SB e SC obtiveram uma concentração de 480 mg/L.

Apenas o tratamento T1 encontra-se dentro dos limites permitidos pela legislação brasileira, ou seja, 200 mg/L a 250 mg/L de cloro ativo (BRASIL,

2009). Embora os tratamentos T2 e T3 tenham apresentado maior redução da carga microbiana, essa concentração de cloro (mg/L) não pode ser usada na higienização de frutas e hortaliças.

Apesar do hipoclorito de sódio ser o saneante mais empregado devido a sua rápida ação, fácil aplicação e completa dissociação em água. O uso de compostos à base de cloro requer alguns cuidados, pois se trata de substância corrosiva, que pode provocar irritações na pele e no trato respiratório (SÃO JOSÉ, VANETTI, 2012). Segundo Srebernich (2007), o uso de saneantes à base de sais de cloro é preocupante porque os mesmos são precursores na formação de cloraminas orgânicas, compostos prejudiciais à saúde por causa do seu alto potencial carcinogênico.

#### **4. CONCLUSÃO**

Nas condições deste experimento pode-se concluir que, as amostras de alfaces analisadas sem tratamento (não higienizada) apresentam uma elevada carga microbiana, assim como, as amostras que passaram pelo tratamento de higienização. Dessa forma, a higienização com hipoclorito de sódio a depender da marca utilizada não atende ao limite estabelecido para os coliformes a 45°C (2,0 log NMP/g), mesmo nas concentrações de cloro ativo permitida pela Resolução de alimentos (até 250 mg/L).

#### **5. REFERÊNCIAS**

AKUTSU, R. C.; BOTELHO, R. A.; CAMARGO, E. B.; SAVIO, K. E. O.; ARAUJO, W. C. Adequação das boas práticas de fabricação em serviços de alimentação. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.18, n.3, p.419-427, 2005.

ANDRADE, N. J. Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Varela, 2008, 412 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução - RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe do Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviço de Alimentação. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 15 Set. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 55, 13 de novembro de 2009. Dispõe sobre Regulamento Técnico para Produtos Saneantes Categorizados como Água Sanitária e Alvejantes à Base de Hipoclorito de Sódio ou Hipoclorito de Cálcio e dá outras. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 13 Nov.. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Legislação em Vigilância Sanitária. Portaria nº 89, de 25 de agosto de 1994. **Diário oficial da República Federalista do Brasil**. Disponível em: <<https://www.google.com.br/search?q=Replublica+Federatista+d+o+Brasil%29&i>>. Acesso em: 03 de mai. de 2014.

BERBARI, S. A. G.; PASCHOALINO, J. E.; SILVEIRA, N. F. A. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. **Ciências Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.2, p.197-201, 2001.

BRUNO, L. M.; PINTO. G. A. S.; Aplicação de cloro Aplicação de cloro no preparo de hortaliças frescas para consumo doméstico, **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.35, n. especial, p. 259-263, 2004.

BOBCO, S. M.; PIEROZAN, M. K.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA D; PINHEIRO, T. L. F.; TONIAZZO, G. Condições Higiênicas de saladas de alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas na cidade de Erechim RS, **Brazilian Journal of Food & Technology**, Campinas, v. 22, n. especial, p. 301-305, 2011.

BOLIVAR, S.; CANTOS, G. A. Qualidade parasitológica e condições higiênico-sanitária de hortaliças comercializadas na cidade de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira Epidemiologia**, São Paulo, v. 8, n. 4, p. 46-48, 2005.

BOTH, C. M. J. **A desinfecção como barreira sanitária na prevenção de doenças transmitidas por alimentos (DTA); sensibilidade de amostra de *Staphylococcus aureus*, isolados em alimentos no IPB-Lacen/RS nos anos de 2002 e 2006, frente o hipoclorito de sódio**. 2007. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

BRACKETT, R. E.; SPLITTSTOESSERS, D. F. Fruits and Vegetables. In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4. ed, Washington: American Public Health Association, p. 515-520, 2001.

FAO/OIE/WHO. Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. In: **Report of a joint FAO/OIE/WHO expert consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance**, p. 107, 2008 Disponível em: < [ftp://ftp.fao.org/ag/agn/food/aquaculture\\_rep\\_13\\_16june2006.pdf](ftp://ftp.fao.org/ag/agn/food/aquaculture_rep_13_16june2006.pdf). Acesso em: 24 de fevereiro de 2013

FIGUEIREDO, F. F. **Desinfecção de alfaces por ação do cloro e do vinagre e desenvolvimentos de um sistema de segurança para alface em estabelecimento de restauração coletiva**. 2013. 87 f. Dissertação, (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária), Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal, 2013.

FRANCO, B. D. G.; M. LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. **Microbiologia de alimentos**. Ed. Atheneu, São Paulo, 2006, p. 13-23.

FRÖDER, H. **Emprego de um método molecular para avaliar a presença de *Listeria monocytogenes* em saladas de hortaliças minimamente processadas.** 2005. 93 f. Dissertação, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

GUIMARÃES, A. M.; ALVES, E. G. L.; FIGUEIREDO, H. C. P.; COSTA, G. M.; RODRIGUES, L. S. Frequência de enteroparasitas em amostras de alface (*Lactuca sativa*) comercializadas em Lavras, Minas Gerais. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 36, n. 5, p.132-135, 2003.

ZENEBO, O. PASCUET, S. **Métodos Químicos e Físicos – químicos para de Alimentos.** 4. ed. Sao Paulo: IMESP, p. 245-246. 2005,

LÓPEZ-GÁLVEZ, F.; TRUCHADO, G. M.; GIL, M. I.; ALLENDE, M. V. S. Cross-contamination of fresh-cut lettuce after a short-term exposure during pre-washing cannot be controlled after subsequent washing with chlorine dioxide or sodium hypochlorite. **Food Microbiology**, Illinois, v.27, n. 2, p.199-204, 2010.

KANEKO, K.; HAYASHIDANI, H.; OHTOMO, Y.; KOSUGE, J.; KATO, M.; TAKAHASHI, K.; SHIRAKI, Y.; OGAWA, M. Bacterial Contamination of Ready-to-eat Foods and Fresh Products in Retail Shops and Food Factories. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 62, n. 6, p. 644-649, 1999.

KEERATIPIBUL, S.; PHEWPAN, A.; LURSINSA, P. Prediction of coliforms and *Escherichia coli* on tomato fruits and lettuce leaves after sanitizing by using Artificial Neural Networks, **Food Science and Technology**, Zürich, v.44, n. 18, p.130-138, 2011.

KLAIBER, R. G.; S. BAUR, G.; WOL. W. P. Quality of minimally processed carrots as affected by warm water washing and chlorination. **Food Control**, Guildford, v. 35, n. 06, p.362-468, 2005

MAISTRO, L. C. **Avaliação Microbiológica Visando a Utilização e Comparação de Métodos Rápidos e Convencionais em Vegetais Folhosos Minimamente Processados**. 2006. 270 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos), Programa de pós- graduação em Ciências dos Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MARIANO, A. M. S. E.; TEIXEIRA, A. N. S.; OKURA, M. H . Eficiência de desinfecção para o tratamento minimamente processado alface e, cultivo meio Hidropônico. **Revista Uberaba**, Uberaba, v.15, n. 2, p. 68 - 78, 2005.

OLIVEIRA, M. L. S.; FIGUEIREDO, E. L.; LOURENÇO, L. F. H.; LOURENÇO, V. V. Análise Microbiológica de Alface (*Lactuca sativa*, L.) e Tomate (*Solanum Lycopersicum*, L), comercializados em Feiras-Livres da cidade de Belém, Pará. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n.143, p. 96-101, 2000.

OLIVEIRA S. A.; ALMEIDA G. A.; SGRIGNOLLI L. A.; OTOBONI, B. M. M. A.; TANAKA Y. A.; DORTA C.; MARINELLI S. P. Levantamento microbiológico da Alface (*Lactuca sativa*, L.) produzida em hortas da cidade de Marília, São Paulo, **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 27, n.18, p. 224-225, 2013.

PACHECO, M. A. S. R.; FONSECA, Y. S. K.; DIAS, H. G. G.; CÂNDIDO, V. L. P.; GOMES, A. H. S.; ARMELIN, I. M.; BERNARDES, R. Condições higiênico-sanitárias de verduras e legumes comercializados no CEAGESP de Sorocaba-SP. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n. 101, p. 50-55, 2002.

SANTO, S. H.; MURATORI, S. C. M.; MARQUES, A. L. A.; ALVES, C. V.; CARDOSO, C. F.; COSTA, R. P. A.; PEREIRA, G. M. M.; ROSA, R. C. M. A. Avaliação da eficácia da água sanitária na sanitização de alfaces (*Lactuca sativa*) **Revista Instituto Adolfo Lutz**, Campinas. v. 22, n.2, p.301-305, 2012.

SÃO JOSÉ, J.F.B.; VANETTI, M.C.D. Effect of ultrasound and commercial sanitizers on natural microbiota and *Salmonella enterica* Typhimurium on cherry tomatoes. **Food Control**, Guildford, v.24, n.1-2, p.95-99, 2012.

SILVA Jr., E. A. Manual de Controle Higiênico-sanitário em Alimentos. ed. 6, Ed. Varela, São Paulo, 2010, 105p.

SREBERNICH, S. M. Utilização de dióxido de cloro e do ácido peracético como substitutos do hipoclorito de sódio na sanitização do cheiro-verde minimamente processado. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.4, p.744-50, 2007.

TAVARES, T.; ARAÚJO A. L. U. S.; UENO M. Patógenos veiculados por saladas de alface servidas em restaurantes. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 23, n. 172, p. 136-141, 2009

WHO/FAO (1998). Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. **Food quality and safety systems A training manual on food hygiene: the hazard analysis and critical control point (HACCP) system**. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/w8088e/w8088e00.HTM>. Acedido a: 5 Fevereiro, 2013.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo tem relevância, ao fornecer a população informações sobre a qualidade bacteriana de vegetais crus prontos para consumo cuja ingestão é amplamente relacionada a boa alimentação e qualidade de vida. Constata-se que esses alimentos podem ser veiculadores de transmissão de micro-organismos patogênicos tornado-se um problema de saúde pública.

Espera-se sensibilizar os proprietários dos restaurantes quanto à importância da implantação das Boas Práticas de Manipulação, e as autoridades

responsáveis do município para uma fiscalização mais intensiva nestes estabelecimentos.

Mesmo com utilização de concentrações de hipoclorito de sódio para higienização das hortaliças, a grande variação de qualidade das marcas comerciais aliada as características intrínsecas do alimento podem resultar na baixa eficiência desse tratamento.

## Anexo

### **NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA ALIMENTÃO & NUTRIÇÃO**

#### Apresentação

São aceitos trabalhos escritos em Português, Espanhol ou Inglês, com título, resumo e termos de indexação no idioma original e em Inglês. Os textos devem ser preparados em espaço 1,5, recomendando-se um máximo de 25 páginas e até cerca de 40 referências bibliográficas. Os trabalhos devem ser encaminhados à **Secretaria do Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (R. Albert Einstein 291, Campinas, SP, 13083-852)** em três vias, ou por e-mail ([revnepa@unicamp.br](mailto:revnepa@unicamp.br)) com aviso de recebimento. Devem ser acompanhados dos seguintes documentos:

- Carta com descrição do tipo de trabalho, contendo os nomes de todos os autores, endereços físicos e de e-mail, instituição à qual se encontra vinculado cada um, telefone/fax, e indicação do autor para correspondência. A carta de encaminhamento deve ser assinada por todos os autores. No caso de envio por e-mail, deverá ser escaneada e anexada à mensagem. Ela deve conter também declaração expressa de submissão somente à revista Segurança Alimentar e Nutricional e de concordância com a cessão dos

direitos de reprodução gráfica à Revista, assinada por todos os autores. Na utilização de figuras e/ou tabelas de outras fontes, os autores deverão entregar documento de autorização de uso das mesmas.

· Em caso de pesquisas realizadas com seres humanos, deve ser apresentada cópia do parecer do Comitê de Ética ao qual foi submetida a pesquisa.

## Organização

Página de título:  
Devem constar: título do trabalho, nome(s) do(s) autor(es) por extenso, com indicação da filiação institucional, se houver. Deve também ser destacado um dos autores, com nome, endereço, telefone, fax e e-mail, para contatos posteriores com a revista. Devem ser informados nesta página no mínimo três termos de indexação, na língua original e em Inglês.

### Resumo:

Os trabalhos devem apresentar resumos na língua original e em Inglês. No caso de trabalhos escritos em Inglês, deverá constar um resumo em Português, além do abstract. Os resumos devem conter até 200 palavras. O estilo deve ser narrativo, com descrição dos objetivos, métodos básicos adotados, e informação da população ou amostragem da pesquisa e métodos estatísticos, porventura, utilizados. Ainda devem constar os resultados e as conclusões mais relevantes, considerando os objetivos do trabalho. O resumo não deve, em hipótese alguma, conter citações bibliográficas ou abreviaturas sem definição.

### Texto:

Os trabalhos deverão seguir a estrutura formal para trabalhos científicos, com exceção dos manuscritos apresentados como Revisão.

### Introdução:

Esta seção deve conter revisão da literatura atualizada e pertinente ao tema, apresentando o problema, os objetivos e as justificativas que conduziram ao trabalho. O estilo deverá ser direto e conciso.

Metodologia ou material e métodos:

Deve conter descrição clara e resumida. Se as técnicas ou procedimentos utilizados já tiverem sido publicados, deverá ser mencionada a fonte bibliográfica, incluindo somente os detalhes que representem modificações substanciais ao procedimento original. A descrição deve conter:

- procedimentos adotados ou citação da fonte bibliográfica do procedimento original;
- universo da amostra;
- instrumentos de medida e, se houver, o método de validação;
- tratamento estatístico.

Resultados:

Os resultados devem ser apresentados sempre que possível mediante o uso de tabelas e figuras, respaldadas por cálculos estatísticos. Tabelas e figuras devem ser limitadas a 10 no conjunto, numeradas de forma seqüencial com algarismos arábicos e obedecendo a ordem de menção dos dados. As tabelas e figuras devem ser apresentadas de forma que sejam legíveis e autoexplicativas, com título breve. O autor deve se responsabilizar pela qualidade das figuras e tabelas, levando em consideração que irão ocupar o espaço de uma ou duas colunas (7 e 15 cm respectivamente).

Discussão:

Deve ser breve e restrita aos aspectos significativos do trabalho, procurando explorar de forma científica e objetiva os resultados. Esta seção se caracteriza por apresentar comparações com outras observações já registradas na literatura. Caso a natureza do trabalho o permita. As seções de “Resultados” e “Discussão” podem alternativamente ser apresentadas em conjunto, sob o título geral de “Resultados e Discussão”.

### Conclusões:

Nesta seção, deve ser apresentado o significado prático ou teórico dos pontos mais relevantes do trabalho, considerando o tema da segurança alimentar e nutricional.

### Agradecimentos (optativo):

Espaço limitado a três linhas onde devem ser apresentados reconhecimentos especiais dos autores.

### Referências Bibliográficas:

Sugere-se um limite de 40 referências, que devem seguir o estilo Vancouver. Sua adequação e exatidão são de responsabilidade exclusiva dos autores.

### Citações no texto

As citações inseridas no texto do trabalho devem seguir o estilo Vancouver que, resumidamente contemplam:

- numeração seqüencial das citações com algarismos arábicos, colocados entre colchetes, seguindo a ordem em que forem mencionadas.
  - os números correspondentes devem também constar da lista bibliográfica no final do artigo.
- Sobrenome e iniciais (sem pontos) de todos os autores devem figurar, até o sexto autor. A

partir daí, os nomes são omitidos e se escreve a expressão latina "et al."

- é altamente recomendável consultar o site:

<http://www.lib.monash.edu.au/tutorials/citing/vancouver.html>

### Citações na lista de referências

As referências citadas no texto devem ser colocadas em ordem numérica na lista de referências e devem obedecer ao estilo Vancouver.

Exemplos:

Livros

Belik W (org.) Políticas de Seguridad Alimentaria y Nutrición en América Latina. São Paulo: Hucitec; 2004.

Germano, MIS Treinamento de Manipuladores de Alimentos: fator de segurança alimentar e promoção da saúde. São Paulo: Livraria Varela; 2003.

Capítulos de livros

Martinelli, MA El Codex Alimentarius y la inocuidad de alimentos. In: Belik W (org.) Políticas de Seguridad Alimentaria y Nutrición en América Latina. São Paulo: Hucitec; 2004.

Artigos apresentados em congressos, simpósios, encontros científicos e outros eventos.

Ferrari RA & Silveira R. Valorização de sub-produtos da industrialização do maracujá – aproveitamento das sementes. In: Livro de resumos do XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 3; 2000 8 – 10 agosto; Fortaleza, Ceará: SBCTA; 2000. p. 11.91

Artigos em periódicos

Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D. Identification of tissue transglutaminase as the auto antigen of celiac disease. Nature Medicine. 1997; 3:797-801.

Dissertações, teses e relatórios

Fonseca MCP. Opinião dos consumidores sobre os riscos alimentares à saúde: o caso da carne bovina [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2005. 252 p.

Sumar-Kalinowski L. Amaranthus sp. El pequeño gigante, Relatório UNICEF. Cusco: UNICEF; 1986. p1-24. World Health Organization. Study Group on Diabetes Mellitus. Technical Report Series, 727. Second report. Geneva; 1985.

Documento em formato eletrônico

Boog, MCF. Construção de uma proposta de ensino de nutrição para o curso de enfermagem. Rev Nutr [periódico eletrônico] 2002 [citado em 2002 jun 10]; 15(1). Disponível em: <http://www.scielo.br/rn>