

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Avaliação microbiológica de alfaces (*Lactuca sativa*) em restaurantes
self-service no Município de Limeira - SP**

Maria Teresa Trovó de Almeida

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Piracicaba

2006

Maria Teresa Trovó de Almeida
Nutricionista

**Avaliação microbiológica de alfaces (*Lactuca sativa*) em restaurantes
self-service no Município de Limeira - SP**

Orientador:
Prof. Dr. **CLÁUDIO ROSA GALLO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2006

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Almeida, Maria Teresa Trovó de
Avaliação microbiológica de alfaces (*Lactuca sativa*) em restaurantes self-service no município de Limeira-SP / Maria Teresa Trovo de Almeida. - - Piracicaba, 2006.
91p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. Alface 2. Contaminação de alimentos 3. Higiene de alimentos 4. Microbiologia de alimentos 5. Restaurantes 6. Segurança alimentar I. Título

CDD 664.8

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Dedico este trabalho ao meu marido – José Luiz, ao meu filho – Víctor Luiz e à minha mãe – Encarnação pela compreensão, apoio e incentivo durante todo o tempo de execução deste projeto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente:

- a Deus por me ajudar a superar as dificuldades vividas durante a elaboração deste trabalho;
- ao Prof. Dr. Cláudio Rosa Gallo pela orientação, apoio, incentivo e amizade;
- ao Prof. Dr. Carlos Tadeu dos Santos Dias pela cooperação e orientação;
- ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da ESALQ-USP pela contribuição com os materiais utilizados;
- ao Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza pela concessão do afastamento parcial para cumprimento dos créditos obrigatórios do curso de Pós-Graduação de Ciência e Tecnologia de Alimentos;
- às técnicas do Laboratório de Microbiologia: Cecília, Denise e Rose pela ajuda e orientação;
- às bibliotecárias: Bia, Midiam e Raquel pelo atendimento e orientação; e
- às colegas: Cristiane, Giovana, Íris, Jacqueline, Lilia, Maria Rita e Michele pelo apoio e amizade.

“Pode-se viver no mundo uma vida magnífica quando se sabe trabalhar e amar: trabalhar pelo que se ama e amar aquilo em que se trabalha”. Leon Tolstói

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Fatores envolvidos no consumo do produto.....	18
2.2 Microrganismos de interesse na presente pesquisa.....	21
2.2.1 Coliformes a 45°C.....	21
2.2.2 <i>Salmonella</i> spp.....	21
2.2.3 <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	23
2.2.4 Aeróbios mesófilos.....	25
2.3 Importância de higienização e desinfecção de folhosos.....	26
2.3.1 Processo de higienização de utensílios, bancadas e mesas de apoio.....	27
2.3.2 Higienização dos vegetais folhosos.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Obtenção de amostras.....	30
3.2 Análises microbiológicas.....	31
3.3 Preparo das amostras.....	31
3.4 Microrganismos analisados.....	32
3.4.1 Número mais provável (NMP) de coliformes totais e fecais.....	32
3.4.2 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	34
3.4.3 Enumeração de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	38
3.4.4 Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos em placas.....	40
3.5 Procedimento das análises microbiológicas do produto sob desinfecção em solução clorada e em solução de vinagre.....	41
3.6 Análise estatística.....	42

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1 Caracterização.....	43
4.2 Coliformes totais e coliformes a 45°C.....	48
4.3 Aeróbios mesófilos.....	50
4.4 <i>Salmonella</i> spp.....	51
4.5 <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	52
4.6 Análises microbiológicas realizadas com amostras após a desinfecção no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da ESALQ.....	77
5 CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS.....	83

RESUMO

Avaliação microbiológica de alfaces (*Lactuca sativa*) em restaurantes *self service* no Município de Limeira – SP.

Amostras da hortaliça alface, pronta para consumo e sem adição de temperos, foram obtidas de sete restaurantes de padrão *self-service*, que servem refeição por quilograma. O total de 35 amostras foi coletado em dias alternados e diretamente do balcão de distribuição desses restaurantes na cidade de Limeira-SP. As amostras foram analisadas com o objetivo de conhecer as condições microbiológicas de hortaliças folhosas cruas servidas em locais de mesmo padrão. Para a realização das análises foram estabelecidos parâmetros microbiológicos, considerando a pesquisa das seguintes bactérias: coliformes totais, coliformes a 45°C, *Salmonella* spp, contagem total de aeróbios mesófilos e *Staphylococcus* coagulase positiva. Os resultados foram bastante heterogêneos, com grande variação nas contagens para coliformes totais, coliformes a 45°C, e números elevados nas contagens de aeróbios mesófilos. Os dados obtidos mostraram que 31 (88,6%) amostras analisadas apresentaram níveis elevados de coliformes totais, com variação entre 10^2 NMPg⁻¹ e 10^5 NMPg⁻¹ e apenas 4 (11,4%) das amostras apresentaram níveis reduzidos, entre <2 e $8,0 \times 10^1$ NMPg⁻¹. Em relação às bactérias coliformes a 45°C, 14 (40%) das amostras apresentaram contaminação, consideradas em desacordo com a legislação vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2001) que estabelece limites de até 10^2 NMPg⁻¹. Nenhuma amostra revelou-se positiva para *Salmonella* spp, atendendo aos parâmetros estabelecidos pela ANVISA (BRASIL, 2001) de ausência em 25g de produto. Foi detectado *Staphylococcus* coagulase positiva em 21 (60%) das amostras considerando contagens superiores a 10^3 UFCg⁻¹, que é o limite máximo tolerado pela ANVISA (BRASIL, 2001) para outros alimentos, já que para hortaliças *in natura* não há menção de padrões. Deste total de 21 amostras, 2 (9,5%) apresentaram contagens de 10^4 UFCg⁻¹. Os 7 locais tiveram amostras com contagens totais de aeróbios mesófilos elevadas, entre 10^5 e 10^7 UFCg⁻¹: em 6 (17,1%) das amostras as contagens ficaram entre 10^5 e 10^6 UFCg⁻¹ e 29 (82,8%) apresentaram resultados superiores a 10^6 UFCg⁻¹. Destas 29 amostras, 11 (37,9%) estiveram acima da 10^7 UFCg⁻¹. Amostras da hortaliça de mesmo lote foram submetidas a procedimentos higiênicos, utilizando solução clorada e solução de vinagre e posterior análise. Os resultados apresentaram reduções entre 98% e 99% nas contagens das bactérias. Pelos dados obtidos, considera-se que há falhas decorrentes de práticas inadequadas de manipulação com ausência ou deficiência de sanificação, sendo necessário treinamento de funcionários e proprietários dos locais, visando correção dos problemas, para que se obtenha a qualidade microbiológica adequada do produto e assegure a saúde do consumidor.

Palavras-chave: *Self-service*; Salada de alface sem adição de tempero; Avaliação microbiológica; Bactérias; Contaminação; Higiene e saúde

ABSTRACT

Microbiological analysis of lettuces (*Lactuca sativa*) at self-service restaurants in the city of Limeira – SP.

Lettuce samples, ready for consumption and without addition of seasoning, were obtained from seven *self-service* restaurants which serve food per kilogram. The total of 35 samples was collected on alternate days and directly from food counters at those restaurants in the city of Limeira/SP. Samples were analyzed with the objective to find out the microbiological conditions of the raw leafy vegetables served in *self-service* restaurants. To carry out the analysis, microbiological standards were set considering the research on the following bacteria: total coliforms, coliforms at 45°C, *Salmonella* spp, total counting of aerobic mesophiles and *Staphylococcus* coagulase positive. The results were very heterogeneous due to the great variation on counting for total coliforms, coliforms at 45°C, as well as the high level of the numbers of aerobic mesophiles. The data obtained showed that 31 (88.6%) samples presented high level of total coliforms, varying between 10^2 NMPg⁻¹ and 10^5 NMPg⁻¹ and only 4 (11.4%) samples presented reduced level, between < 2 and 8.0×10^1 NMPg⁻¹. Considering the coliform bacteria at 45°C, 14 (40%) samples presented fecal contamination and this is at variance with the current legislation of the National Agency of Sanitary Vigilance – ANVISA (BRAZIL, 2001), which establishes limits up to 10^2 NMPg⁻¹. No samples showed to be positive for *Salmonella* spp, following the ANVISA (BRAZIL, 2001) standards which establish absence in 25g of product. *Staphylococcus* coagulase positive was detected in 21 (60%) samples considering counting superior to 10^3 UFCg⁻¹, which is the maximum limit tolerated by ANVISA (BRAZIL, 2001) for other foods, as for leafy vegetables *in natura* there are no standards. From this total of 21 samples, 2 (9.5%) showed 10^4 UFCg⁻¹. The seven *self-service* restaurants showed high level for total counting of aerobic mesophiles, between 10^5 and 10^7 UFCg⁻¹: 6 samples (17.1%) showed counting between 10^5 and 10^6 UFCg⁻¹ and 29 (82.8%) presented results above 10^6 UFCg⁻¹. From these 29 samples, 11 (37.9%) were above 10^7 UFCg⁻¹. Leafy vegetables samples from the same batch underwent to hygienic procedures using a chlorine solution and a vinegar solution for posterior analysis. The results showed reduction of the bacteria counting between 98% and 99%. The data obtained show that there is inappropriate food handling with absence of or deficiency of sanitation, indicating a training need for the staff and shop owners, so that problems can be corrected to obtain products with appropriate microbiological quality and to assure consumer's health.

Key-words: *Self-service*; Lettuce salad without seasoning; Microbiological analysis; Bacteria; Contamination; Hygiene and health

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Procedimento para preparo das diluições.....	32
Figura 2 - Contagem de Coliformes totais e Coliformes fecais pelo método do número mais provável (NMP).....	33
Figura 3 - Kit “1-2 Test” para <i>Salmonella</i> spp. da Bio Control.....	35
Figura 4 - Imunobanda característica de positividade para <i>Salmonella</i>	36
Figura 5 - Procedimento para detecção de <i>Salmonella</i> spp.....	37
Figura 6 - Detecção de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	39
Figura 7 - Procedimento analítico para detecção de aeróbios mesófilos.....	40
Figura 8 - Percentual de amostras em acordo e em desacordo comparados ao limite permitido pela RDC nº 12 de 02.01.01, referente ao NMPg ⁻¹ de coliformes a 45°Cg ⁻¹ (Local A).....	55
Figura 9 - Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente à contagem total em placas para aeróbios mesófilos (Local A).....	55
Figura 10 - Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente a <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (Local A).....	56

- Figura 11 - Percentual de amostras em acordo e em desacordo comparados ao limite permitido pela RDC nº 12 de 02.01.01, referente ao NMPg⁻¹ de coliformes a 45°Cg⁻¹ (Local B)..... 57
- Figura 12 - Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente à contagem total em placas para aeróbios mesófilos (Local B)..... 58
- Figura 13 - Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente a *Staphylococcus* coagulase positiva (Local B)..... 59
- Figura 14 - Percentual de amostras em acordo e em desacordo comparados ao limite permitido pela RDC nº 12 de 02.01.01, referente ao NMPg⁻¹ de coliformes a 45°Cg⁻¹ (Local C)..... 60
- Figura 15 - Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente à contagem total em placas para aeróbios mesófilos (Local C)..... 61
- Figura 16 - Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente a *Staphylococcus* coagulase positiva (Local C)..... 62
- Figura 17 - Percentual de amostras em acordo e em desacordo comparados ao limite permitido pela RDC nº 12 de 02.01.01, referente ao NMPg⁻¹ de coliformes a 45°Cg⁻¹ (Local D)..... 63

- Figura 18 - Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente à contagem total em placas para aeróbios mesófilos (Local D)..... 64
- Figura 19 - Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente a *Staphylococcus* coagulase positiva (Local D)..... 65
- Figura 20 - Percentual de amostras em acordo e em desacordo comparados ao limite permitido pela RDC nº 12 de 02.01.01, referente ao NMPg⁻¹ de coliformes a 45°Cg⁻¹ (Local E)..... 66
- Figura 21 - Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente à contagem total em placas para aeróbios mesófilos (Local E)..... 67
- Figura 22 - Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente a *Staphylococcus* coagulase positiva (Local E)..... 68
- Figura 23 - Percentual de amostras em acordo e em desacordo comparados ao limite permitido pela RDC nº 12 de 02.01.01, referente ao NMPg⁻¹ de coliformes a 45°Cg⁻¹ (Local F)..... 69
- Figura 24 - Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente à contagem total em placas para aeróbios mesófilos (Local F)..... 70

- Figura 25 - Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente a *Staphylococcus* coagulase positiva (Local F)..... 70
- Figura 26 - Percentual de amostras em acordo e em desacordo comparados ao limite permitido pela RDC nº 12 de 02.01.01, referente ao NMPg⁻¹ de coliformes a 45°Cg⁻¹ (Local G)..... 72
- Figura 27 - Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente à contagem total em placas para aeróbios mesófilos (Local G)..... 73
- Figura 28 - Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente a *Staphylococcus* coagulase positiva (Local G)..... 73
- Figura 29 - Percentual de adequação dos resultados das análises microbiológicas apresentados pelos 07 locais, envolvidos no estudo..... 75
- Figura 30 - Ilustração das condições microbiológicas dos locais em relação aos microrganismos estudados..... 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados das análises microbiológicas.....	43
Tabela 2 - Locais e datas das coletas.....	45
Tabela 3 - Horários das coletas nos 07 locais.....	46
Tabela 4 - Número de pessoas por local nos horários das coletas.....	46
Tabela 5 - Produto picado por local e coleta.....	47
Tabela 6 - Temperatura ambiente por local e coleta.....	48
Tabela 7 - Coeficiente de variação (%)......	75
Tabela 8 - Comparativo entre os locais através da média, segundo as variáveis, coliformes totais, coliformes 45°C, aeróbios mesófilos e <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	76
Tabela 9 - Resultados das análises microbiológicas do produto após desinfecção no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da ESALQ.....	78

1 INTRODUÇÃO

A alimentação tende a ser mais diversificada quando são considerados fatores como: aumento de renda, situação geográfica e abastecimento de alimentos.

A saúde e a alimentação são produtos de uma relação ecológica onde a economia e a educação desempenham papel preponderante.

O consumo de alimentos deve promover satisfação, ser disponível e diversificado em quantidade e qualidade nutricional, além de ser livre de contaminações que possam levar ao desenvolvimento de doenças de origem alimentar.

Nas últimas décadas, a situação do país relacionada aos hábitos alimentares tem sofrido modificações. A rápida urbanização da população brasileira e a sua concentração nas grandes metrópoles vêm revolucionando a alimentação do brasileiro. A refeição fora de casa passa a dominar a alimentação no Brasil.

A falta de tempo disponível para a preparação dos alimentos e/ou para o consumo vem despertando a preferência dos consumidores por refeições mais convenientes no que se refere à facilidade de aquisição e preparo. Este fato explica a abertura dos restaurantes de padrão *self-service*, segmento em alto crescimento. Este crescimento apresenta pontos positivos, tais como: a variedade de opções, a rapidez de atendimento e, às vezes, o custo mais acessível. Entretanto, alguns fatores preocupam profissionais da área de alimentação quanto à insegurança dos alimentos, devido ao maior tempo de exposição em temperaturas inadequadas, além de erros e excessos cometidos pela clientela na composição dos pratos.

Essa mudança de comportamento trouxe expansão do mercado de alimentos, atingindo setores da agricultura, indústria e comércio. Calcula-se que o potencial teórico das refeições coletivas no Brasil seja superior a 40 milhões de unidades diariamente, o que indica que o segmento ainda tem muito a crescer, conforme a Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas – ABERC (2005).

Atualmente, com o crescente interesse do meio científico e da população em geral no que diz respeito ao tratamento e/ou prevenção de doenças através da

alimentação, uma nova categoria de alimentos, batizados de alimentos funcionais ou nutracêuticos, tem sido adequadamente pesquisada.

Dentre os vários alimentos/nutrientes pesquisados, certamente as fibras alimentares são as que têm recebido maior atenção devido às suas propriedades funcionais cientificamente comprovadas.

A partir da década de 1970, a fibra passou a ter importância como constituinte necessária de uma dieta normal, em função dos primeiros estudos epidemiológicos que mostravam a incidência de doenças crônicas intestinais nos países desenvolvidos do ocidente, como: constipação, diverticulites e câncer do intestino grosso, as quais foram relacionadas à insuficiência de fibra na dieta. A prevenção e atenuação de doenças cardiovasculares, diabetes e obesidade, tais como determinadas respostas fisiológicas foram consideradas posteriormente como evidências associadas à ingestão de fibra alimentar (CORRÊA, 2002).

Os vegetais folhosos destacam-se entre os alimentos ricos em fibra e observa-se que os hábitos alimentares quanto ao consumo de folhosos vem melhorando. Pode-se perceber a preocupação de redes de *fast food* em lançar, junto com outras novidades, pratos à base de folhosos como alternativa para os consumidores adeptos e freqüentadores de tais locais. Neste contexto, os restaurantes de padrão *self-service* têm cada vez mais ampliado a opção em torno de folhosos, apresentando-os crus e sem adição de molhos gordurosos, propiciando desta forma realmente uma alternativa ao consumidor já bem mais preocupado com a saúde.

A higiene destes alimentos é de extrema importância e caracteriza-se pelos processos que os tornam adequados para o consumo, envolvendo para isso a utilização de técnicas e produtos para limpeza e desinfecção.

Para garantir a segurança destes alimentos a Resolução - RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2001), estabeleceu padrões microbiológicos em relação às bactérias *Salmonella* spp e Coliformes a 45°C. Segundo tais padrões, hortaliças cruas não devem apresentar *Salmonella* spp em 25 g de produto e para Coliformes a 45°C a tolerância para amostra indicativa é de 10^2 NMPg⁻¹.

Considerando o envolvimento da bactéria *Staphylococcus aureus* em surtos de intoxicação alimentar, as amostras de alfaces, coletadas nos locais em estudo desta pesquisa, foram submetidas às análises microbiológicas para a detecção dessas bactérias através do método tradicional para a estimativa das unidades formadoras de colônias por grama de produto.

A tolerância para amostra indicativa teve como parâmetro para contagem em placas 10^3 UFCg⁻¹, que é o limite máximo tolerado para outros alimentos crus, uma vez que a ANVISA (BRASIL, 2001) não menciona padrão dessas bactérias para alfaces.

Na literatura, a International Commission on Microbiological Specifications for Foods - ICMSF (1978) e Leitão (1981) recomendam alguns grupos de microrganismos para a avaliação microbiológica, incluindo microrganismos não patogênicos cuja presença em maior ou menor número é indicativa das condições da matéria-prima e do processamento utilizado. São incluídos neste grupo microrganismos mesófilos e psicotróficos.

Considerando as características do alimento em estudo, foram realizadas análises microbiológicas para contagem padrão em placas de microrganismos aeróbios mesófilos, adotando-se como parâmetro a tolerância de até 10^6 UFCg⁻¹, visto que valores acima deste podem indicar: exposição à contaminação ambiental; permanência por tempo prolongado em temperatura inadequada de refrigeração; e armazenamento em temperatura morna, que são fatores que colaboram para a perda da qualidade do produto com provável deterioração.

Dado o interesse pelo consumo alimentar de folhosos crus e a preocupação com a qualidade microbiológica, o presente trabalho teve os objetivos de levantar a situação da presença de bactérias patogênicas e/ou indicadoras de condições higiênic-sanitárias em alfaces e identificar possíveis falhas nos locais de amostragem para, dependendo do interesse dos proprietários dos estabelecimentos, tentar implementar sistemas de controle de qualidade dos alimentos oferecidos. Se tal contato direto com os proprietários não acontecer, espera-se que tais resultados se tornem de domínio público para que possam servir de subsídios aos órgãos responsáveis com a finalidade de intensificar treinamentos, orientações e autuações.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fatores envolvidos no consumo do produto

Os alimentos de origem vegetal são geralmente consumidos na sua forma crua e têm recebido, cada vez mais, preferência na dieta humana. Entretanto, a busca por uma alimentação mais saudável vem aumentando o risco de transmissão de doenças veiculadas por estes alimentos, em função das condições em que o produto é exposto durante o período de produção e distribuição (GARG; CHUREY; SPLITTSTOESSER, 1990; MADDEN, 1992).

O perfil microbiológico de alimentos vegetais depende de diversos fatores que vão desde as etapas de produção primária até o seu preparo para o consumo final (BRACKETT, 1992). O solo parece ser o responsável pela maioria das contaminações, seguido da utilização de água não tratada para irrigação e condições impróprias de lavagem e estocagem (ODUMERU et al., 1997).

A qualidade e segurança microbiológica desses alimentos podem também ser comprometidos por manipulação incorreta e utilização de equipamentos não sanitizados que contribuem para o aumento das populações microbianas e contaminação cruzada por patogênicos. Procedimentos de corte e retirada de casca levam, geralmente, ao aumento do número de microrganismos e a diminuição da vida útil (BRACKETT, 1992).

Storck e Dias (2003) relataram que preparações, como saladas, ficam expostas nos bufês de vários restaurantes, por longo período e, na maioria das vezes, sob uma temperatura inadequada, ou seja, acima de 10°C, colocando em dúvida a qualidade da refeição servida.

O binômio tempo-temperatura constitui-se em um fator muito importante na distribuição de refeições, devendo ser monitorado diariamente com o auxílio de termômetros, sendo que o responsável pelo restaurante deve estar consciente desta necessidade (SILVA JUNIOR, 2002).

André et al., (1999), verificaram a temperatura de saladas de vegetais com maionese em restaurantes comerciais *self-service*, que servem por quilograma, e encontraram temperaturas que variaram entre 14,7°C e 34,2°C, revelando que todas as amostras apresentavam-se com valores de temperatura acima de 10°C, não obedecendo aos critérios preconizados para armazenamento de pratos frios.

O controle inadequado da temperatura dos alimentos é uma das causas mais freqüentes de enfermidades transmitidas pelos alimentos ou da deterioração destes FAO (2003).

Estudos realizados por Storck e Dias (2003) mostraram que o hábito de realizar as refeições fora de casa está se tornando cada vez mais rotineiro e uma das formas para atender esta demanda são os restaurantes *self-service*, que servem por quilograma.

Os proprietários destes locais, por serem leigos em sua maioria, não têm preocupação de praticar sistemas de controle que assegurem um padrão de qualidade aos alimentos oferecidos nesses estabelecimentos (DAMASCENO et al., 2002).

Conforme Gonçalves (1998), a maioria dos casos de doenças de origem microbiana, transmitidas por alimentos, está relacionada ao mau acondicionamento dos mesmos, contaminação cruzada, deficiente higiene pessoal e de equipamentos, manipuladores infectados, entre outros.

As toxinfecções alimentares, enfermidades causadas pela ingestão de alimentos contaminados e/ou substâncias tóxicas, constituem um importante problema sanitário cujo dimensionamento é dificultado no Brasil devido a não obrigatoriedade de notificação dos surtos (EIROA, 1989).

Frutas e vegetais consumidos crus são associados às doenças de origem alimentar. A higienização com água diminui, mas não elimina a contaminação. Recentemente, surtos têm ocorrido com frutas e outros vegetais frescos, processados em condições sanitárias insatisfatórias, conforme o Center for Disease Control and Prevention – CDC (2006).

Em países desenvolvidos, os registros demonstram que 60% dos surtos de toxinfecção alimentar são causados pelo consumo de alimentos contaminados servidos em restaurantes (LIMA; MELO; SENA, 1998).

Os alimentos, há muito tempo, têm sido alvo de preocupação de órgãos governamentais e epidemiológicos em virtude de suas propriedades. Buscando minimizar esses problemas, normas são ditadas pelos órgãos governamentais competentes, envolvendo colheita, conservação, manipulação, transporte, armazenamento e distribuição dos alimentos nas diversas etapas do processo de produção (BOULOS; BUNHO, 1999).

A segurança é o atributo de qualidade mais desejável. Assim, os produtos hortícolas devem ser isentos de toda e qualquer substância química que possa causar danos à saúde do consumidor. Os padrões de qualidade pré-estabelecidos por leis federais ou estaduais visam à preservação da saúde pública, com base na prevenção do desenvolvimento de microrganismos patogênicos ou prejudiciais, bem como a proteção contra a presença de substâncias tóxicas ou contaminantes, que podem ser resíduos de defensivos ou de outros produtos (CHITARRA, 2000).

Práticas higiênicas eficientes são necessárias em cada etapa da cadeia alimentar, desde a produção até o consumo dos alimentos.

Na literatura, são encontradas citações que revelam a ausência de boas práticas de manipulação para saladas cruas servidas em restaurantes, fato este que se constitui em risco à saúde do consumidor (DAMASCENO et al., 2002; NASCIMENTO; MARQUES, 1998; PALÚ et al., 2002; SIQUEIRA et al., 1997). Estas constatações apontam para a necessidade de promover uma avaliação das condições higiênico-sanitárias desses locais.

O sistema de Análise dos Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) é uma proposta sistematizada de identificação, determinação e controle de perigos, tendo as Boas Práticas de Fabricação (BPF) como pré-requisitos (APPCC, 1997).

2.2 Microrganismos de interesse na presente pesquisa

2.2.1 Coliformes a 45°C

Coliformes a 45°C são bactérias na forma de bastonetes Gram-negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 horas a 44,5° - 45,5°C, sendo membros do grupo das bactérias coliformes fecais (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001).

A definição tem como princípio, indicar apenas os coliformes originários do trato gastrointestinal. Atualmente, reconhece-se que o grupo dos coliformes fecais abrange pelo menos três gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, dos quais dois (*Enterobacter* e *Klebsiella*) incluem cepas de origem não fecal (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001).

Os microrganismos causadores de doenças alimentares podem ser transmitidos pelos dedos de manipuladores de alimentos com hábitos de higiene insatisfatórios, por insetos voadores ou rasteiros e também pela água (JAY, 2005).

Estudos desenvolvidos por Siqueira et al. (1997), em saladas cruas servidas em restaurantes, detectaram a presença de coliformes fecais em níveis acima dos tolerados, indicando condições insatisfatórias para o produto.

Damasceno et al. (2002) e Palú et al. (2002) analisaram hortaliças frescas e saladas cruas em restaurantes de padrão *self-service* e constataram a presença de coliformes fecais em níveis insatisfatórios quando comparados à legislação vigente.

2.2.2 *Salmonella* spp

Salmonelas são bactérias na forma de bacilos Gram-negativos, não esporulados. O gênero compreende cerca de 2.000 sorotipos (HAYES, 1993).

Segundo Jay (2005), algumas mudanças ocorreram na taxonomia de *Salmonella*, sendo que todas as espécies foram agrupadas em apenas duas espécies: a *Salmonella entérica* e a *S. bongori*, e 2.000 ou mais sorovares foram divididos em cinco subespécies ou grupos.

O gênero *Samonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, sendo anaeróbios facultativos, com produção de gás a partir de glicose (exceto *S. typhi*) e capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. A maioria é móvel, pela presença de flagelos peritríquios, exceção feita à *S. pullorum* e à *S. gallinarum*, que são imóveis (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

A taxonomia do gênero *Salmonella* é baseada na composição de seus antígenos de superfície, que são os antígenos somáticos (O), os flagelares (H) e os capsulares (Vi). O antígeno O localiza-se na fração lipopolissacarídica (LPS) da membrana externa. Essa fração é constituída de um lipídeo, denominado lipídio A, responsável pelo efeito tóxico (endotoxina). Os antígenos H são de natureza protéica. Os antígenos O e Vi são termorresistentes, não sendo destruídos pelo aquecimento a 100°C por 2 horas e os antígenos H são termolábeis (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

As salmonelas multiplicam-se em temperaturas entre 7°C e 49,5°C, sendo 37°C a temperatura ótima para desenvolvimento, na qual em 4 horas, o alimento contaminado pode transformar-se em alimento infectante. Abaixo de 7°C, para a maioria dos sorotipos, não há multiplicação (GERMANO; GERMANO, 2003).

Alimentos mais comumente envolvidos em surtos por *Salmonella* são os produtos lácteos (leite e queijos cremosos), ovos (pudins, gemadas, licores de ovos, maionese), carnes e produtos derivados de bovinos, de suínos e de aves. Ainda são apontados como responsáveis pela ocorrência de surtos de salmonelose: peixes, camarões, levedura de cerveja, coco, molho e tempero de salada, sobremesas recheadas com cremes, gelatina em pó, manteiga de amendoim, cacau, chocolate em pó, suco de laranja não pasteurizado (GERMANO; GERMANO, 2003).

Seres humanos podem disseminar salmonelas para outros seres humanos. Portadores assintomáticos e pessoas doentes, que excretam salmonelas nas fezes, podem contaminar suas mãos. Se pessoas com as mãos contaminadas estiverem envolvidas na preparação de alimentos, elas podem inocular a *Salmonella*. Se o

alimento for estocado em local não refrigerado por algumas horas, a bactéria pode multiplicar-se, alcançando número suficiente para causar doença naqueles que o ingerirem (PELCZAR; CHAN ; KRIEG, 1997).

Palú et al. (2002), avaliando amostras de hortaliças frescas em restaurantes *self-service*, encontraram *Salmonella* em saladas de alface.

Damasceno et al. (2002) e Azerêdo; Conceição e Stamford (2004) estudaram as condições higiênicas de restaurantes e de saladas cruas por eles servidas e não detectaram a presença dessa bactéria no produto.

2.2.3 *Staphylococcus coagulase positiva*

De acordo com Martins (2000), os estafilococos são cocos Gram-positivos, catalase positivos, que tendem a formar agrupamentos semelhantes a cachos de uva. Atualmente o gênero *Staphylococcus* é composto por aproximadamente 27 espécies, algumas mais freqüentemente associadas a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista, tanto em seres humanos quanto em animais. Entre elas se destacam, em patologia humana, as espécies: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus haemolyticus*. Tradicionalmente os estafilococos são divididos em duas categorias: coagulase positivos e negativos. Entre os que são considerados coagulase positivos, *Staphylococcus aureus* representa a espécie com maior probabilidade de envolvimento em infecções humanas.

Os estafilococos são bactérias mesófilas que apresentam crescimento em temperatura na faixa de 7°C a 47,8°C; as enterotoxinas são produzidas entre 10°C e 46°C, com ótima produção entre 40°C e 45°C. Os extremos de temperatura dependem de outros parâmetros que devem encontrar-se em condições ótimas. Considera-se que surtos de intoxicação alimentar são provocados por alimentos que permaneceram neste intervalo de temperatura por tempo variável, de acordo com o nível de inóculo e temperatura de incubação. De modo geral, quanto mais baixa for a temperatura, maior

será o tempo necessário para a produção de enterotoxina. Em condições ótimas, a enterotoxina torna-se evidente entre quatro e seis horas (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

As bactérias deste gênero toleram concentrações de 10% a 20% de NaCl e nitratos, tornando os alimentos curados veículos potenciais para as mesmas (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Em relação ao pH, *S. aureus* cresce na faixa de 4,0 a 9,8, com o ótimo entre 6,0 e 7,0 (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

De acordo com Franco e Landgraf (2003), quando se considera a Aa (Atividade de água), os estafilococos são os únicos capazes de crescerem em valores inferiores aos normalmente considerados mínimos para as bactérias não-halófilas. O valor mínimo da Aa considerado é de 0,86 apesar de, sob condições ideais, esta bactéria já ter se desenvolvido em Aa de 0,83.

Conforme a ICMSF (1996), a bactéria *S.aureus* compete mal com outras bactérias e por isto raramente causa intoxicação alimentar em produtos crus; uma exceção é o leite cru de vaca com mastite.

Hobbs e Roberts (1993) relatam que a ocorrência dos primeiros surtos por toxinfecções estafilocócicas foram provocadas pela contaminação proveniente das mãos e falhas no tempo e na temperatura que permitiram a multiplicação da bactéria.

Os alimentos também podem ser contaminados por *S.aureus* através de práticas higiênicas inadequadas em qualquer etapa do processamento, portanto o controle é obtido protegendo os alimentos (ICMSF, 1996).

Durante anos a bactéria *S. aureus* foi considerada a única espécie do gênero *Staphylococcus* capaz de produzir enterotoxinas, bem como de produzir coagulase, até que outras espécies produtoras de coagulase, tais como *S. hyicus* e *S. intermedius*, foram identificadas e, inclusive, surtos de intoxicação foram atribuídos a estas duas espécies (SILVA; GANDRA, 2004).

Compatibilizando a legislação brasileira a estes fatores, e devido a grande semelhança fenotípica entre as três espécies de *Staphylococcus*, foram estipulados limites para presença de estafilococos coagulase positiva em alimentos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2001), enquanto que a anterior,

Portaria 451, de 19 de setembro de 1997, estipulava parâmetros para contagens de *S. aureus*.

Como característica da doença, *S. aureus* causa intoxicação proveniente da ingestão do alimento contendo a toxina pré-formada. Deste modo, o agente causal não é a bactéria em si, mas várias toxinas (A, B, C₁, C₂, C₃, D, E) formadas por esta bactéria, conhecidas como enterotoxinas. Atualmente, sabe-se que as espécies *S. intermedius* e *S. hyicus* também são capazes de produzir tais toxinas (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

O período de incubação médio da doença é de duas a quatro horas (de 30 minutos a 8 horas). O início dos sintomas é, geralmente, rápido e de natureza aguda, variando com o grau de suscetibilidade do indivíduo, concentração da enterotoxina no alimento, quantidade consumida do alimento e o estado pregresso do paciente (GERMANO; GERMANO, 2003).

Os principais sintomas são náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarreia. Em geral não há febre. Nos casos mais graves pode ocorrer cefaléia e prostração. A recuperação, na maior parte dos casos, dá-se de 24 a 48 horas (GERMANO; GERMANO, 2003).

Palú et al. (2002), em estudo de avaliação microbiológica de frutas e hortaliças frescas em restaurantes *self-service*, detectaram duas cepas de *Staphylococcus* produtoras de enterotoxinas, isoladas de salada de alface.

2.2.4 Aeróbios mesófilos

Os microrganismos aeróbios mesófilos não estão diretamente relacionados com a saúde do homem, sendo sua presença ou contagem indicadora de deterioração ou contato excessivo ambiental (SILVA JUNIOR, 2002).

Azerêdo; Conceição e Stamford (2004), ao realizarem estudo com o objetivo de caracterizar a qualidade higiênico-sanitária das refeições servidas no Restaurante Universitário de João Pessoa (RUJP) – Campus I, verificaram que 10 (31,25%)

amostras positivas (incluindo arroz, carne guisada, farofa de cuscuz, feijão, lingüiça e salada crua) apresentavam elevada contagem de bactérias aeróbias mesófilas com valores máximos oscilando entre 8×10^2 a 8×10^5 UFCg⁻¹.

Segundo Franco e Landgraf (2003), a contagem elevada desse grupo de bactérias nos alimentos não perecíveis é indicativa do uso de matéria-prima contaminada ou processamento insatisfatório, sob o ponto de vista sanitário. Em relação aos alimentos perecíveis, pode indicar abuso durante o armazenamento em relação ao binômio tempo/temperatura. A deterioração de alimentos pode ser causada por números elevados, considerando-se que alterações nos alimentos são detectáveis em contagens superiores a 10^6 UFCg⁻¹.

Leite Júnior et al. (2000) fizeram alusão ao fato da elevada presença de bactérias mesófilas em carne de sol, o que para eles indica que o produto foi preparado com matéria-prima altamente contaminada, que o processamento foi insatisfatório do ponto de vista sanitário e que o alimento foi mantido em condições inadequadas de tempo e temperatura. Contagens de aeróbios mesófilos elevadas, as quais possuem temperaturas ótimas de crescimento próximas a do corpo humano, significam que pode ter ocorrido multiplicação de bactérias patogênicas de origem humana ou animal.

2.3 Importância da higienização e desinfecção de folhosos

A higiene dos alimentos se caracteriza, principalmente, por processos pelos quais os alimentos se tornam higiênica e sanitariamente adequados para o consumo, abrangendo a utilização de técnicas de processamento, utilizando o calor ou o frio para a garantia dos produtos, e também o uso de técnicas e produtos para limpeza e desinfecção de vários gêneros de alimentos (SILVA JUNIOR, 2002).

Segundo Andrade e Macêdo (1996), o uso de sanificantes visa eliminar microrganismos patogênicos das superfícies de equipamentos e utensílios que entram em contato com alimentos, contribuindo para melhoria da qualidade microbiológica e

higiênico-sanitária dos alimentos, evitando riscos à saúde do consumidor pela veiculação de patógenos.

Como procedimentos gerais para este tipo de produto, ou seja, folhosos crus, a ABERC (2001) recomenda preparar um local próprio para higienização, como bancadas, cubas, panelas e monoblocos, fazendo a desinfecção destes locais.

2.3.1 Processo de higienização de utensílios, bancadas e mesas de apoio

Visando garantir a adequada manutenção da higiene de utensílios, bancadas e mesas de apoio, os quais entram em contato direto com o produto, a ABERC (2001) considera necessário seguir criteriosamente alguns procedimentos de higiene, os quais compreendem desde a retirada de resíduos, aplicação de água e detergente com posterior enxágüe e desinfecção utilizando solução clorada a 200ppm por 15 minutos ou borrifar álcool 70%.

2.3.2 Higienização dos vegetais folhosos

Estudo realizado por Leitão et al. (1981) mostrou a eficácia da higienização de verduras, sendo que a lavagem inicial das folhas resultou na eliminação de 74% da microbiota bacteriana. A eficiência do hipoclorito de sódio a 200ppm entre 15 e 20 minutos resultou na eliminação de 93,2% para contagem total em placas e 94,5% para coliformes totais. Quando analisados comparativamente, o vinagre diluído a 2% com imersão entre 15 e 20 minutos foi mais eficiente que o cloro, apresentando reduções de 98,0% para contagem total em placas e 99,8% para coliformes totais.

A seguir estão relacionadas as etapas consideradas necessárias para a adequada higienização e desinfecção de folhosos.

Conforme Leitão et al. (1981) e Silva Junior (2002), depois de desprezadas as partes estragadas, deve-se lavar em água corrente potável folha a folha e em seguida deve-se proceder a etapa de desinfecção.

Considerando a Portaria nº 6 do Centro de Vigilância Sanitária, São Paulo, de 10 de março de 1999 – CVS-6 (SÃO PAULO, 1999) são recomendadas as seguintes diluições: 10 mL (1 colher de sopa rasa) de água sanitária para uso geral a 2,0%-2,5% em 1 litro de água ou 20 mL (2 colheres de sopa rasa) de hipoclorito de sódio a 1% em 1 litro de água. Na solução clorada, o produto deve permanecer em imersão de 15 a 20 minutos, com posterior enxágüe.

A solução clorada a 200ppm deve ser substituída a cada lote imerso ou ser reutilizada quando o monitoramento da solução indicar um mínimo de 100ppm de cloro ativo. Para que possa ser reutilizada, a solução não deve ter muitos resíduos nem apresentar turvação, de acordo com a ABERC (2001).

Estudos realizados por Garg; Churey e Splittstoesser (1990); Beuchat et al. (1998), utilizando cloro como sanitizante em folhas de alface, mostraram resultados satisfatórios na eliminação de microrganismos.

Outras soluções à base de cloro podem ser utilizadas, desde que sejam idôneas, observando-se as recomendações do fabricante e verificando-se a adequação da concentração final de cloro em ppm. Todos os produtos devem estar registrados no Ministério da Saúde, segundo a ABERC (2001).

Segundo a ABERC (2001), o vinagre, quando utilizado, não constitui uma etapa de desinfecção, apenas de limpeza. Permite uma redução de larvas e insetos que ficam aderidos às folhas e minimiza o gosto de cloro resultante da desinfecção.

Conforme Arruda (1996), após a imersão em solução clorada, deve-se em caso de verduras utilizar também a desinfecção em solução de ácido acético que tem como objetivo a redução de microrganismos, parasitas e seus ovos.

O efeito do ácido acético sobre a contaminação de vegetais foi estudado por Leitão et al. (1981), Eiroa; Porto (1996) e Entani et al. (1998), sendo constatados bons resultados na redução de patógenos.

A exposição de folhas de alface na concentração de vinagre a 2%, por período de 30 minutos, comprometeu em parte as características do folhoso, causando murchamento parcial (LEITÃO et al., 1981).

A maior parte dos ácidos orgânicos é eficaz na redução dos valores de pH (pH 5,5) que ao penetrarem na célula bacteriana, acidificam seu interior, danificando-a ou destruindo-a (SMULDERS et al., 1986).

Estudos de Cherrington et al. (1991) mostraram que, além de afetar o pH intracelular e o metabolismo bacteriano, os ácidos orgânicos causam alteração do DNA. Diferentes bactérias respondem de modo desigual aos ácidos orgânicos, conforme demonstram os trabalhos de Glass e Doyle (1991), Erickson e Jenkins (1991) e Erickson et al. (1993), os quais constataram que a *Listeria monocytogenes* era mais resistente ao ácido acético do que a *Samonella* spp.

Além da correta higienização e desinfecção do produto, os locais devem implementar as Boas Práticas e o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), os quais segundo Silva Junior (2002), são, sem dúvida, as ferramentas atuais mais eficientes para controle de perigos ao consumidor em toda a cadeia de produção de alimentos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras

O presente trabalho foi constituído de coleta de folhosos crus (alfaces) prontos para o consumo e sem tempero, servidos em quilograma em sete diferentes restaurantes *self-service*, na cidade de Limeira – SP.

Esta amostragem representa cerca de 60% dos estabelecimentos de mesmo padrão existentes no município.

Entre os locais pode-se considerar 01 de grande porte, 03 de médio porte e 01 de pequeno porte, localizados na região central da cidade e outros 02 de pequeno porte localizados fora da região central, afastados aproximadamente 2 quilômetros da área central da cidade.

As amostras foram coletadas nas embalagens descartáveis existentes nos estabelecimentos, diretamente no balcão de distribuição, na quantidade de 300 gramas, com cinco coletas em cada estabelecimento, totalizando 35 amostras, que foram analisadas em duplicatas.

As coletas foram realizadas no período de 14.02.05 a 13.06.05, sendo 5 coletas em cada local. O produto foi coletado nos diferentes locais em diferentes horários entre 11h00m e 12h30m.

As embalagens onde as amostras foram coletadas receberam identificação e foram mantidas armazenadas em bolsa térmica, contendo pedras de gelo a uma temperatura de 3°C a 4°C, até o momento das análises microbiológicas.

Na 4ª coleta os locais B e G tiveram seu produto submetido à desinfecção em solução clorada e solução de vinagre, seguido das análises microbiológicas; o mesmo procedimento ocorreu com os locais A, C, D, E e F durante a 5ª coleta.

As amostras coletadas foram transportadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ - USP em Piracicaba, onde foram analisadas.

3.2 Análises microbiológicas

Foram realizadas as análises microbiológicas em duplicata para a estimativa do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 45°C e para presença/ausência de *Salmonella* spp, bactérias para as quais existem padrões estabelecidos pela ANVISA (BRASIL, 2001) e também para *Staphylococcus* coagulase positiva, aeróbios mesófilos e coliformes totais para uma melhor avaliação das condições higiênico-sanitárias das amostras.

As análises microbiológicas foram realizadas através de metodologias tradicionais para bactérias coliformes totais, coliformes a 45°C e aeróbios mesófilos, descritas por Silva; Junqueira e Silveira (2001) e Swanson; Petran e Hanlin (2001); e *Staphylococcus* coagulase positiva de acordo com Lancette e Bennett (2001).

As análises microbiológicas para *Salmonella* foram realizadas conforme método oficial aprovado pela Association of Official Analytical Chemists – AOAC (2000).

3.3 Preparo das amostras

Para as análises de coliformes totais, coliformes a 45°, aeróbios mesófilos e *Staphylococcus* coagulase positiva fez-se as diluições das amostras. Foram utilizados 50 gramas de cada amostra de alface para 450mL de água peptonada a 0,1% esterilizada e posteriormente homogeneizados em liquidificador esterilizado, obtendo-se assim a diluição de 10^{-1} . A partir dessa diluição, foram feitas diluições em série até a obtenção da diluição 10^{-6} , sempre se transferindo 10mL de cada diluição para frascos esterilizados contendo 90mL de água peptonada 0,1% (Figura 1).

Para a análise de *Salmonella*, as amostras foram submetidas ao pré-enriquecimento, onde foram pesados 25 gramas de cada amostra de alface e transferidos para um erlenmeyer contendo 225mL de Caldo Lactosado esterilizado, conforme (Figura 5).

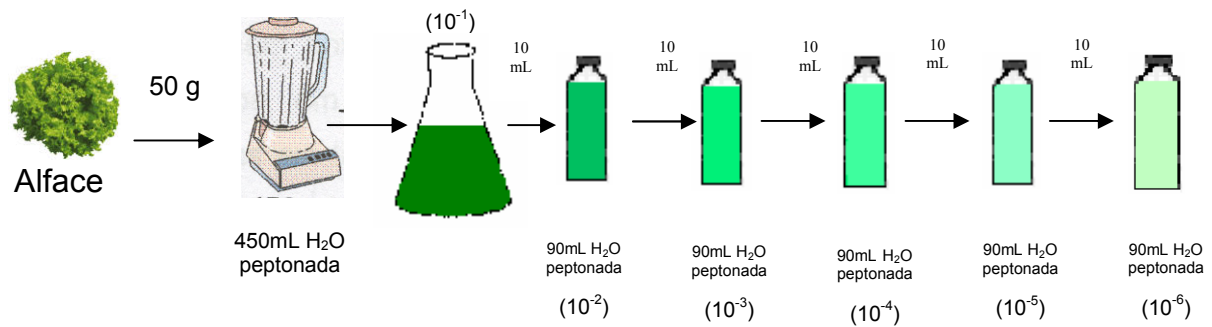


Figura 1 – Procedimento para preparo das diluições

3.4 Microrganismos analisados

3.4.1 Número mais provável (NMP) de coliformes totais e fecais

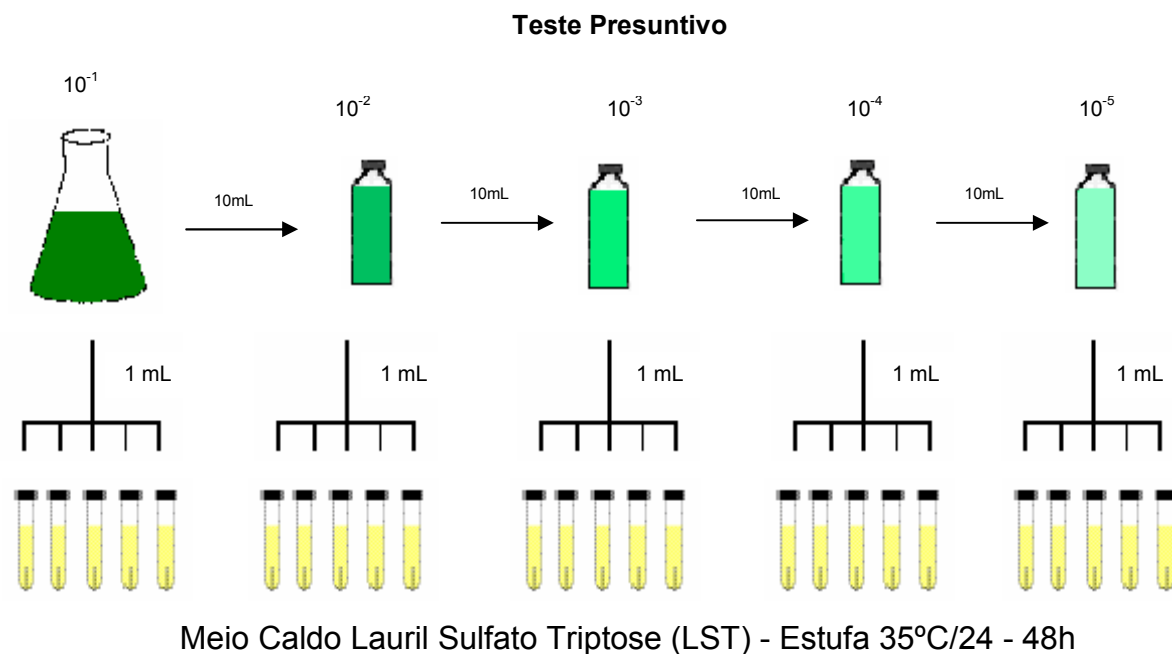
O Número Mais Provável de coliformes totais e fecais foi determinado pelo método clássico de fermentação da lactose, através da técnica dos tubos múltiplos de acordo com Silva; Junqueira e Silveira (2001) e Swanson; Petran e Hanlin (2001).

Esta técnica permite a recuperação de células injuriadas através de um enriquecimento e compreende duas fases distintas: a fase do teste presuntivo e a fase do teste confirmativo, onde se determina a população de coliformes totais e fecais.

Para o teste presuntivo selecionou-se cinco séries de tubos de ensaio contendo tubos de Durham e Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), identificando-se as diluições de 10^{-1} a 10^{-5} e os respectivos locais, adicionando 1,0 mL da diluição correspondente por tubo de ensaio. As cinco séries de tubos foram incubadas a 35°C por 24-48 horas. Após o período de incubação, os tubos que apresentaram produção de gás devido à fermentação da lactose do meio foram considerados positivos no teste presuntivo. Os tubos que após 48 horas não apresentaram nenhuma alteração nos tubos de Durham, foram considerados negativos.

Com auxílio de alça de níquel-cromo foram realizadas inoculações a partir dos tubos positivos do teste presuntivo para tubos contendo Caldo Verde Brilhante Lactose Bile (CVBLB) e tubos com caldo EC. Os tubos CVBLB foram incubados em estufa a 35°C/24-48h para teste confirmativo de coliformes totais e os tubos EC em banho-maria a 44,5-45°C/24h para teste confirmativo de coliformes fecais. Após os respectivos períodos de incubação, verificou-se a produção de gás nos tubos de Durham colocados nos meios de cultivo do teste confirmativo e a partir destes tubos positivos (gás) foi feita a consulta à Tabela de Thomas (1942), apud Swanson; Petran e Hanlin (2001) para a estimativa do NMP de coliformes totais e coliformes a 45°C.

Os resultados obtidos foram comparados com os padrões da legislação vigente para o produto, segundo a ANVISA (BRASIL, 2001).



(continua)

Figura 2 – Estimativa de coliformes totais e coliformes fecais pelo método do número mais provável (NMP)

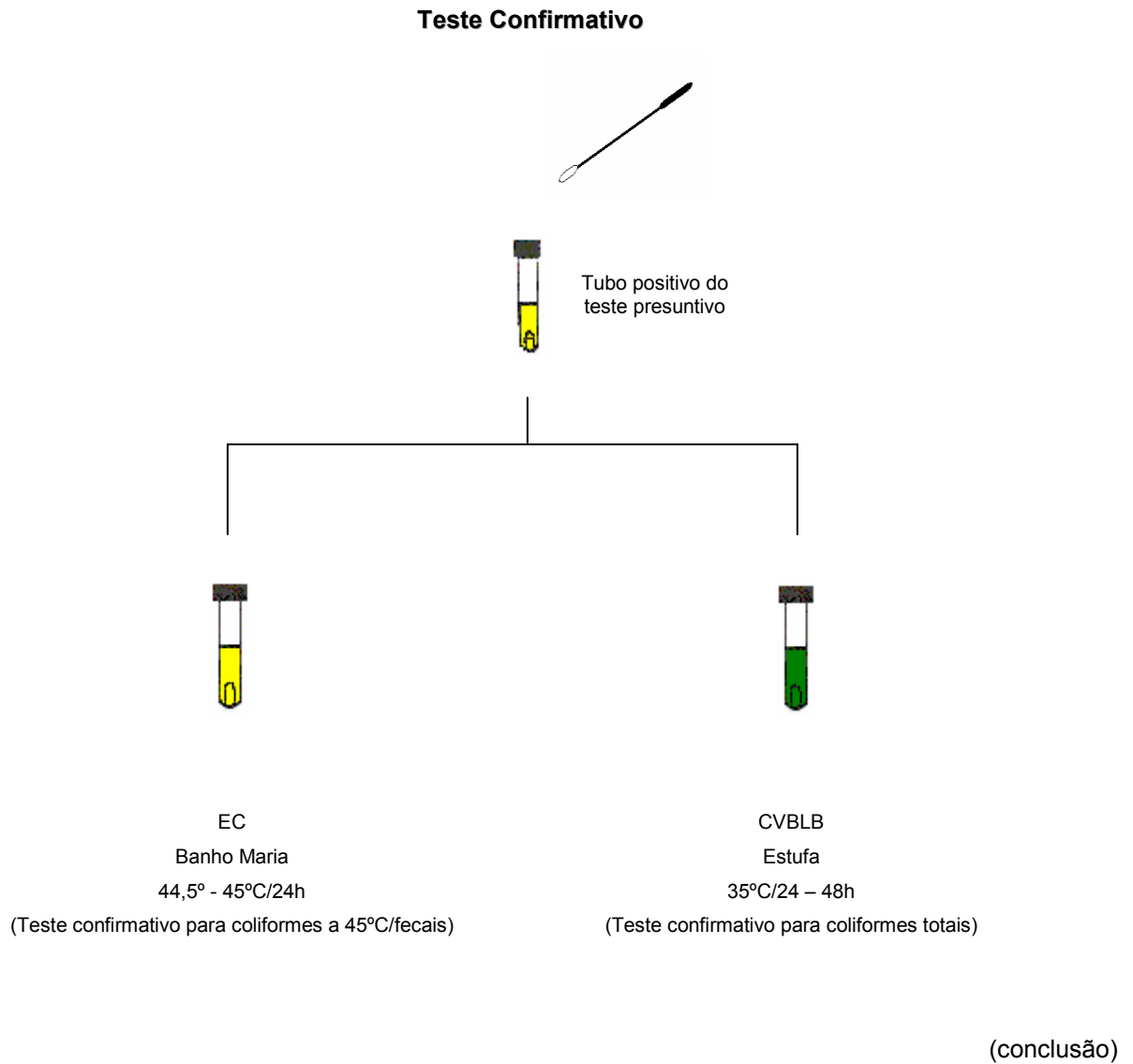


Figura 2 – Estimativa de coliformes totais e coliformes fecais pelo método do número mais provável (NMP)

3.4.2 Pesquisa de *Salmonella* spp

Para as análises microbiológicas de pesquisa de *Salmonella* spp têm sido bastante utilizados métodos rápidos de detecção, com resultados obtidos no prazo de 24-36 horas.

No desenvolvimento deste estudo utilizou-se o método *Salmonella* 1-2 TEST, da BioControl. Trata-se de um método oficial aprovado pela AOAC (2000) recomendado para a detecção presuntiva das espécies móveis de *Salmonella* em alimentos.



Figura 3 – Kit “1-2 Test” para *Salmonella* spp. da BioControl

O princípio se baseia na observação da imobilização pelos anticorpos polivalentes H (flagelar contidos no meio de motilidade, com o desenvolvimento de uma banda visual bem definida chamada de imunobanda), (Figura 4).

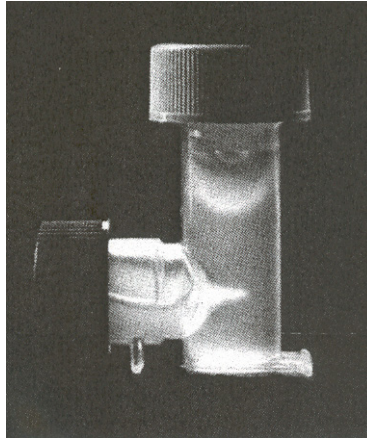


Figura 4 – Imunobanda característica de positividade para *Salmonella*

Foi feito um pré-enriquecimento de cada amostra analisada, incubando-se 25 gramas de alface em um erlenmeyer contendo 225mL de Caldo Lactosado. Os frascos foram incubados por 18–24h a 35°C. Decorrido o período de incubação foi feito o enriquecimento seletivo, transferindo-se 1mL do pré-enriquecimento para um tubo de ensaio contendo 9mL de solução Caldo tetrionato verde brilhante ativado com iodo-iodeto, sendo incubado por 6 horas em banho-maria, a 42°C (Figura 5).

Após o período de incubação do enriquecimento seletivo, procedeu-se o preparo dos kits 1-2 Test da seguinte forma: posicionou-se a tampa preta para cima, retirando-a e removeu-se o plug da câmara usando uma pinça estéril; desprezou-se o conteúdo deste compartimento e inoculou-se 1,5mL da solução caldo tetrionato preparado separadamente; os kits foram posicionados com a tampa branca para cima retirando-a e cortando a ponta interna desta tampa; adicionou-se 1 gota de anticorpo, princípio responsável pela aglutinação e formação do gel que se forma junto da tampa branca. Os kits foram incubados a 35°C por 14–30 horas. Após o período de incubação observou-se a formação ou não de imunobanda que caracteriza a positividade do teste para a bactéria *Salmonella*.

Os resultados obtidos foram comparados com os padrões da legislação vigente para o produto conforme a ANVISA (BRASIL, 2001).

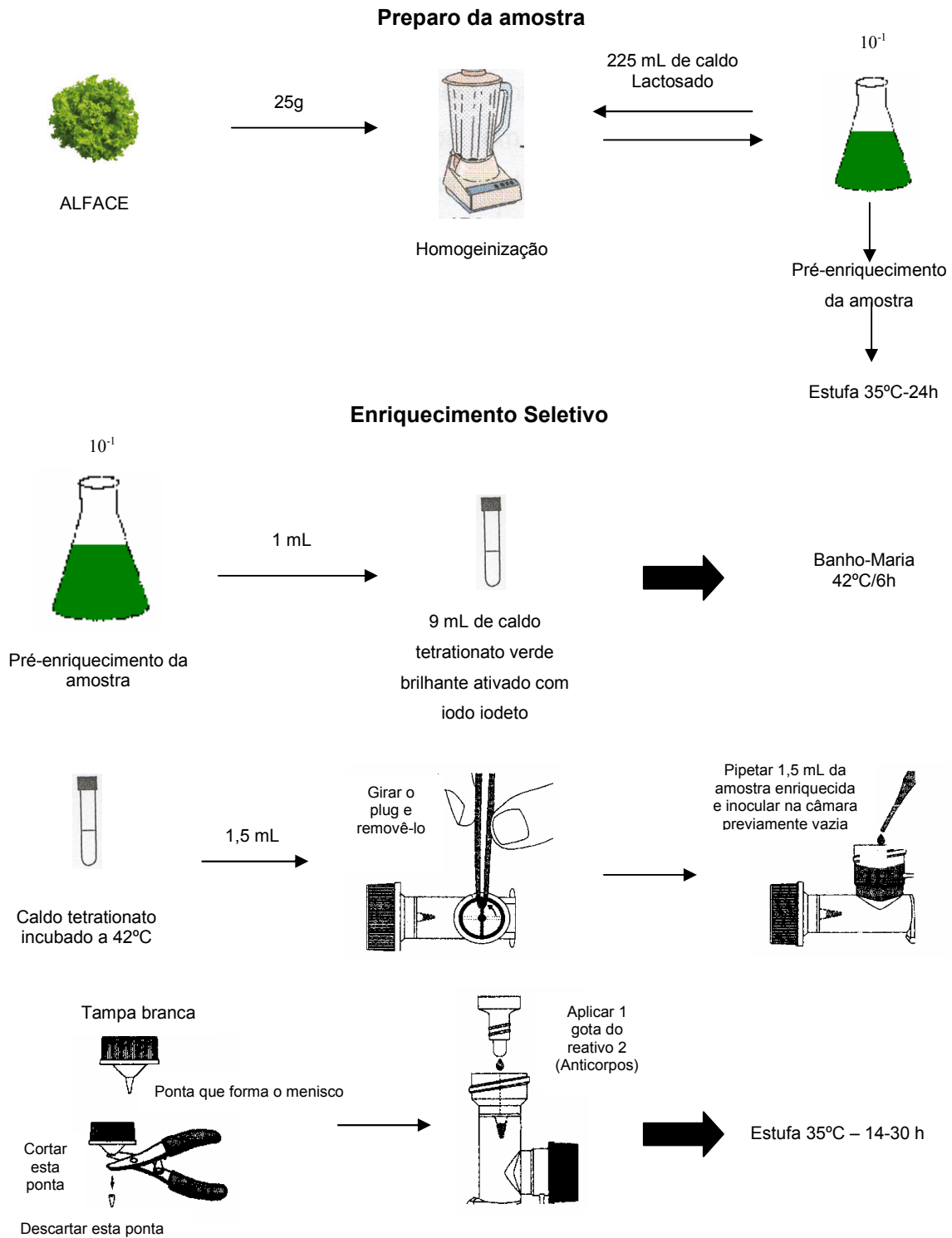


Figura 5 – Procedimento para detecção de *Salmonella* spp

3.4.3 Enumeração de *Staphylococcus coagulase positiva*

Para a contagem presuntiva de *Staphylococcus coagulase positiva* foi utilizado o método de contagem direta em placas, com semeadura em superfície e espalhamento com alça de Drigalsky descrito por Lancette e Bennett (2001).

Das diluições 10^{-1} e 10^{-2} preparadas previamente conforme o item 3.3, foram retiradas para cada amostra de alface dos 7 locais, alíquotas de 0,3 + 0,3 + 0,4mL totalizando 1mL de 10^{-1} , alíquotas de 0,1mL de 10^{-1} e 0,1mL de 10^{-2} , e inoculadas na superfície de placas de Petri contendo o meio Ágar Baird-Parker (BPA), previamente preparadas. O inóculo foi espalhado com alça de Drigalsky até que todo o excesso de líquido fosse absorvido. Após a secagem completa, as placas foram invertidas e incubadas a 35°C por 24-48 horas (Figura 6).

Para a contagem presuntiva utilizaram-se todas as placas contendo de 30 a 300 colônias e com o auxílio de uma lupa em um contador de colônias, foram contadas as colônias típicas, ou seja, pretas, circulares, pequenas, com bordas perfeitas, lisas, convexas e rodeadas por um halo transparente e/ou uma zona transparente. Também foram escolhidas algumas colônias que não preenchiam todos os requisitos mencionados, para a realização da prova de produção de coagulase.

Para o teste de coagulase, retirou-se a colônia suspeita do meio BPA com o auxílio de uma alça níquel-cromo e transferiu-se para tubos de 10 x 100mm (estéreis) com 0,5mL de Coagu-Plasma (plasma de coelho) com EDTA, misturando-os lentamente em movimentos circulares e se incubou a 37°C, observando-se no prazo de 4h até 24h a formação de um coágulo, que caracteriza a positividade da prova.

Os resultados obtidos foram comparados em relação à tolerância de 10^3 UFCg⁻¹, estabelecida para este estudo.

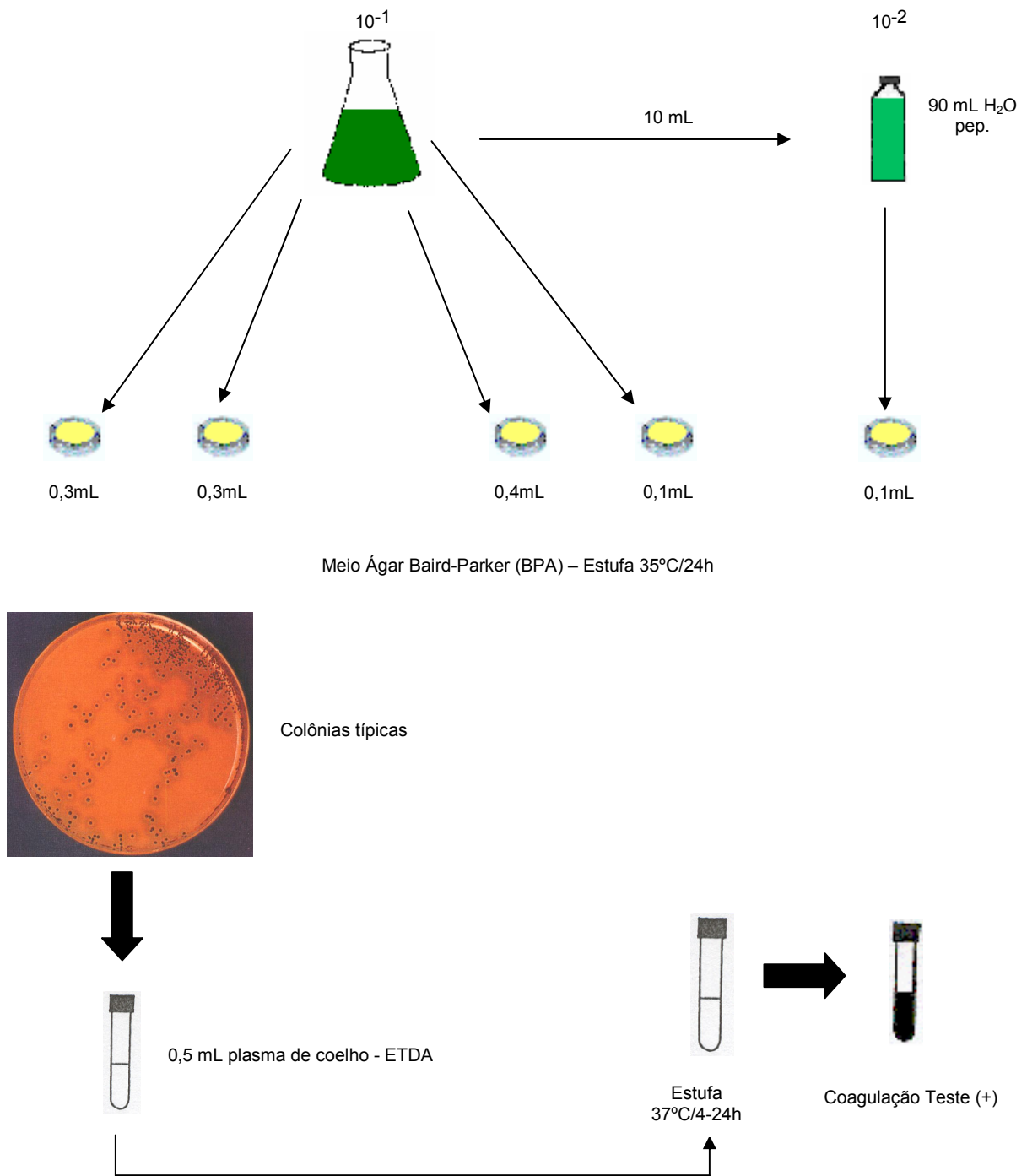


Figura 6 – Detecção de *Staphylococcus coagulase* positiva

3.4.4 Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos em placas

Para a contagem total de aeróbios mesófilos foi utilizado o método de plaqueamento em profundidade. Foram selecionadas as diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} das diluições preparadas previamente conforme item 3.3, das quais retirou-se alíquotas de 1mL, inoculando em placas de Petri previamente esterilizadas, conforme Swanson; Petran e Hanlin (2001). A cada placa inoculada foi adicionado de 15 a 20mL do meio Plate Count Agar (PCA), previamente fundido e resfriado até a temperatura de 45°C , de acordo com Silva; Junqueira e Silveira (2001). Com as placas em superfície plana e através de movimentos circulares suaves e em movimento na forma de oito o inóculo foi misturado. Aguardou-se a completa solidificação do meio, invertendo as placas e incubando a 35°C por 48 horas (Figura 7).

Para a contagem das colônias foram selecionadas as placas que continham entre 30 e 300 colônias. A contagem foi feita com o auxílio de uma lupa, em um contador de colônias. As análises foram feitas em duplicata e obtida a média aritmética das contagens das UFCg^{-1} .

Os resultados obtidos foram comparados com os padrões estabelecidos para o estudo (até 10^6 UFCg^{-1}).

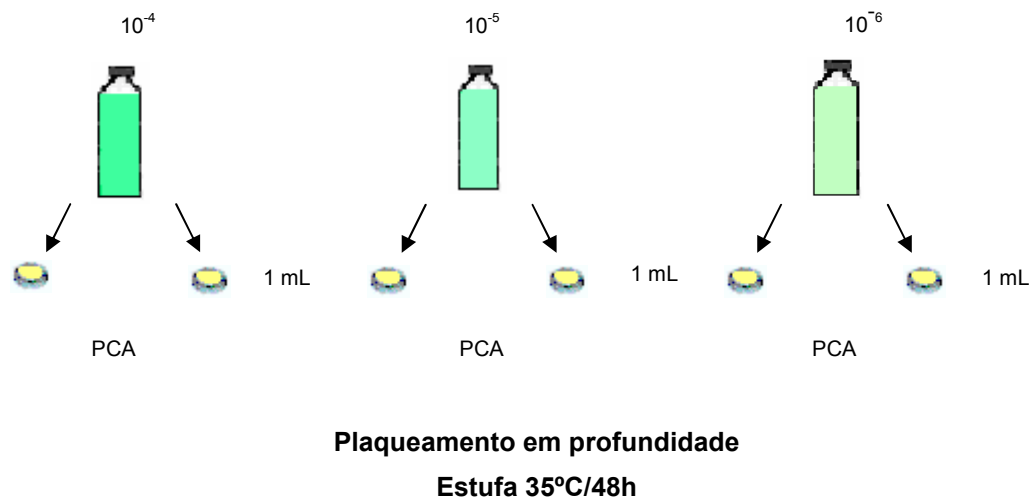


Figura 7 – Procedimento analítico para detecção de aeróbios mesófilos

3.5 Procedimento das análises microbiológicas do produto sob desinfecção em solução clorada e em solução de vinagre

Preparação da amostra:

Em laboratório as amostras de alface foram higienizadas com água destilada e esterilizada.

A solução clorada foi preparada usando-se um litro de água destilada e esterilizada com a adição de 10mL de água sanitária com 2,0-2,5% de cloro, conforme a Portaria CVS-6 (SÃO PAULO, 1999). O pH da água sanitária com 2,0-2,5% de cloro foi medido, obtendo-se pH de 12,8 e posteriormente mediu-se o pH da solução clorada (diluição 1%), que resultou em 10,0. De acordo com Silva Junior (2002), o pH da água sanitária deve ser de 13,5 no produto puro e 11,5 quando diluído a 1%.

Cada amostra de alface foi colocada em imersão de solução clorada por 15 minutos em um Becker previamente esterilizado. Após o tempo determinado ocorreu o enxágüe das amostras em água destilada e esterilizada.

Como etapa de finalização as amostras foram colocadas em solução de vinagre a 2% por 15 minutos, sem posterior enxágüe. Tal procedimento baseou-se nas orientações de Arruda (1996) e em estudo desenvolvido por Leitão et al. (1981) com ácido acético, na forma de vinagre.

Após o processo de desinfecção foram realizadas as análises microbiológicas para os microrganismos coliformes totais, coliformes a 45°C, *Staphylococcus* coagulase positiva e aeróbios mesófilos.

Os resultados foram comparados com os padrões da ANVISA (BRASIL, 2001), para coliformes a 45°C, enquanto para aeróbios mesófilos e *Staphylococcus* coagulase positiva os padrões de referência utilizados foram os estabelecidos para o estudo.

3.6 Análise estatística

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas foram submetidos à análise da variância, com testes de comparação múltipla de Tukey, obtendo-se a comparação entre as médias dos locais. Os valores gerados pelos testes de Tukey são resultantes da aplicação da fórmula $\log_{10} (\text{variável} + 0,5)$, onde ocorreu a transformação dos valores devido à heterogeneidade de variância e detectou-se a diferença entre as médias dos locais em relação aos microrganismos coliformes a 45°C, pelo sistema computacional SAS (2002-2003). Posteriormente foram submetidos à análise Biplot (GABRIEL, 1971).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização

A microbiota de vegetais retirados da terra deve ser a mesma do solo onde esses vegetais cresceram, embora ocorram exceções. A alta quantidade de água presente nos vegetais favorece a deterioração bacteriana e o baixo conteúdo de carboidratos e gorduras sugere que uma boa parte dessa água está disponível. A média do pH dos vegetais está dentro dos limites de crescimento de várias bactérias, por isso o fato de que estas são os agentes de decomposição mais comuns nos vegetais. O potencial de oxirredução relativamente alto dos vegetais e sua baixa toxicidade sugerem que as bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas são mais importantes do que as anaeróbias (JAY, 2005).

As contagens totais de bactérias em hortaliças são utilizadas como parâmetros da carga microbiana presente, não indicando se a população tem efeito benéfico ou prejudicial. Contudo servem como um alerta das condições de higiene durante a manipulação e armazenamento, como também dos potenciais riscos oferecidos à saúde do consumidor (BRASIL, 1997; BRASIL, 2001; ICMSF, 1980).

Na Tabela 1 estão representados os resultados das análises microbiológicas realizadas na presente pesquisa.

Tabela 1 – Resultados das análises microbiológicas

(continua)

Coletas e Locais	Microrganismos				
	Coliformes Totais NMPg ⁻¹	Coliformes a 45°C NMPg ⁻¹	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva UFCg ⁻¹	Aeróbios mesófilos UFCg ⁻¹	<i>Salmonella</i> spp

Local A

1 ^a	5,4 x 10 ³	1,4 x 10 ¹	7,0 x 10 ²	1,8 x 10 ⁷	ausente em 25g
2 ^a	3,3 x 10 ²	5,0 x 10 ¹	4,5 x 10 ³	2,0 x 10 ⁶	ausente em 25g
3 ^a	5,4 x 10 ³	2,4 x 10 ³	3,0 x 10 ²	7,7 x 10 ⁵	ausente em 25g
4 ^a	2,2 x 10 ²	9,0 x 10 ¹	2,1 x 10 ³	7,9 x 10 ⁵	ausente em 25g
5 ^a	3,5 x 10 ³	5,0 x 10 ¹	3,1 x 10 ³	8,2 x 10 ⁶	ausente em 25g

Tabela 1 – Resultados das análises microbiológicas

(continuação)

Coletas e Locais	Microrganismos				
	Coliformes Totais NMPg ⁻¹	Coliformes a 45°C NMPg ⁻¹	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva UFCg ⁻¹	Aeróbios mesófilos UFCg ⁻¹	<i>Salmonella</i> spp
Local B					
1 ^a	9,2 x 10 ³	9,2 x 10 ³	1,9 x 10 ³	1,6 x 10 ⁷	ausente em 25g
2 ^a	9,2 x 10 ³	9,2 x 10 ³	8,0 x 10 ²	2,6 x 10 ⁶	ausente em 25g
3 ^a	9,2 x 10 ³	3,5 x 10 ³	3,6 x 10 ²	1,5 x 10 ⁶	ausente em 25g
4 ^a	5,4 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁵	6,5 x 10 ²	1,8 x 10 ⁶	ausente em 25g
5 ^a	2,2 x 10 ⁴	2,0 x 10 ³	2,0 x 10 ⁴	5,1 x 10 ⁶	ausente em 25g
Local C					
1 ^a	1,6 x 10 ⁴	2,2 x 10 ²	1,3 x 10 ⁴	1,0 x 10 ⁶	ausente em 25g
2 ^a	9,2 x 10 ³	3,5 x 10 ³	8,8 x 10 ²	1,6 x 10 ⁷	ausente em 25g
3 ^a	9,2 x 10 ³	1,3 x 10 ²	7,5 x 10 ²	1,4 x 10 ⁶	ausente em 25g
4 ^a	1,4 x 10 ⁴	2,0 x 10 ³	4,5 x 10 ³	2,5 x 10 ⁶	ausente em 25g
5 ^a	9,2 x 10 ³	< 2	4,0 x 10 ³	1,9 x 10 ⁷	ausente em 25g
Local D					
1 ^a	9,2 x 10 ³	2,8 x 10 ²	2,0 x 10 ³	5,0 x 10 ⁶	ausente em 25g
2 ^a	1,6 x 10 ⁴	2,0 x 10 ¹	9,6 x 10 ²	1,2 x 10 ⁷	ausente em 25g
3 ^a	4,6 x 10 ⁴	< 2	3,6 x 10 ³	1,7 x 10 ⁷	ausente em 25g
4 ^a	2,4 x 10 ³	2,0 x 10 ¹	7,0 x 10 ³	8,8 x 10 ⁶	ausente em 25g
5 ^a	2,2 x 10 ³	< 2	6,2 x 10 ³	1,2 x 10 ⁷	ausente em 25g
Local E					
1 ^a	2,4 x 10 ³	2,0 x 10 ¹	1,5 x 10 ³	2,5 x 10 ⁷	ausente em 25g
2 ^a	1,7 x 10 ⁴	< 2	1,4 x 10 ²	2,6 x 10 ⁶	ausente em 25g
3 ^a	1,6 x 10 ⁴	2,7 x 10 ²	2,8 x 10 ³	1,1 x 10 ⁶	ausente em 25g
4 ^a	4,9 x 10 ⁴	< 2	4,8 x 10 ³	1,9 x 10 ⁷	ausente em 25g
5 ^a	8,0 x 10 ¹	2,0 x 10 ¹	5,0 x 10 ³	1,5 x 10 ⁶	ausente em 25g
Local F					
1 ^a	2,3 x 10 ⁴	8 x 10 ³	1,5 x 10 ¹	8,4 x 10 ⁶	ausente em 25g
2 ^a	1,7 x 10 ⁴	< 2	4,1 x 10 ²	2,7 x 10 ⁶	ausente em 25g
3 ^a	5,0 x 10 ¹	< 2	1,2 x 10 ³	2,8 x 10 ⁵	ausente em 25g
4 ^a	< 2	< 2	4,0 x 10 ³	5,9 x 10 ⁵	ausente em 25g
5 ^a	1,7 x 10 ²	< 2	1,6 x 10 ²	2,5 x 10 ⁶	ausente em 25g

Tabela 1 – Resultados das análises microbiológicas

(conclusão)

Coletas e Locais	Microrganismos				
	Coliformes Totais NMPg ⁻¹	Coliformes a 45°C NMPg ⁻¹	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva UFCg ⁻¹	Aeróbios mesófilos UFCg ⁻¹	<i>Salmonella</i> spp

LOCAL G

1 ^a	5,4 x 10 ³	2,0 x 10 ¹	9,0 x 10 ²	5,7 x 10 ⁶	ausente em 25g
2 ^a	5,4 x 10 ³	4,0 x 10 ¹	1,0 x 10 ³	1,4 x 10 ⁷	ausente em 25g
3 ^a	1,6 x 10 ⁶	6,0 x 10 ³	3,0 x 10 ³	9,7 x 10 ⁶	ausente em 25g
4 ^a	2,4 x 10 ³	2,0 x 10 ¹	6,5 x 10 ³	3,0 x 10 ⁷	ausente em 25g
5 ^a	1,7 x 10 ¹	< 2	2,3 x 10 ³	9,2 x 10 ⁵	ausente em 25g

Médias de 2 repetições, expressas em NMPg⁻¹ e UFCg⁻¹ de alface.

A higiene dos vegetais é muito importante porque, assim como o ser humano necessita de alimentos com uma quantidade de microrganismos patogênicos compatíveis com a sua resistência imunológica, não devem ser ingeridos resíduos de produtos detergentes ou desinfetantes que possam interferir na fisiologia digestiva, causando transtornos que simulam gastroenterites intoxicativas, resultando em uma falsa intoxicação alimentar e propiciando aparecimento de sintomas alérgicos ou de má digestão (SILVA JUNIOR, 2002).

Os aspectos que merecem destaque no trabalho em questão estão reportados nas Tabelas apresentadas a seguir.

Tabela 2 - Locais e datas das coletas

Locais	Datas das coletas				
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a
A	14/02	14/03	04/04	02/05	06/06
B	14/02	14/03	04/04	02/05	06/06
C	14/02	14/03	04/04	02/05	06/06
D	14/02	14/03	25/04	30/05	06/06
E	14/02	28/03	25/04	30/05	13/06
F	28/02	28/03	25/04	30/05	13/06
G	28/02	28/03	25/04	30/05	13/06

Percebe-se que as coletas foram realizadas em etapas diferentes, considerando-se 02 grupos de estabelecimentos, sendo o 1º grupo (A, B, C e D) e o 2º grupo (E, F e G).

O local D, por ocasião das 3ª e 4ª coletas, não oferecia alface, portanto essas amostras foram coletadas posteriormente junto com as dos locais E, F e G.

Tabela 3 - Horários das Coletas nos 07 locais

Locais	Horários das Coletas				
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª
A	11h15min	11h45min	11h35min	12h15min	11h10min
B	11h30min	12h15min	11h10min	11h30min	12h00min
C	11h45min	12h00min	11h25min	11h45min	12h15min
D	12h20min	11h30min	11h40min	11h30min	11h30min
E	12h45min	11h10min	12h25min	11h05min	11h10min
F	11h15min	11h50min	12h20min	12h25min	12h00min
G	12h00min	11h35min	11h10min	11h15min	12h20min

Para realização das coletas cumpriram-se horários diferenciados, procurando seguir os horários de abertura e de maior fluxo de atendimento.

Tabela 4 – Número de pessoas por local nos horários das coletas

Locais	Nº de Pessoas/Local e Coleta				
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª
A	10	10	35	45	06
B	02	15	03	01	07
C	03	20	04	03	16
D	02	01	01	01	01
E	15	04	15	16	10
F	08	03	04	07	05
G	05	06	04	03	08

Nota-se que o fluxo de pessoas variou bastante de uma coleta para outra entre os locais. Este fato pode ser atribuído ao rodízio de horários e à disponibilidade dos

horários dos consumidores. É possível perceber que os restaurantes A, B, C e E apresentaram o maior número de frequência durante as coletas.

Na Tabela 5 é apresentada a forma de apresentação da alface nas refeições, ou seja, picada ou não.

Tabela 5 - Produto picado por local e coleta

Locais	Produto cortado por coleta				
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a
A	S ⁽¹⁾	S	S	N	N
B	S	S	S	S	S
C	N ⁽²⁾	N	N	N	N
D	S	S	S	S	S
E	S	N	N	N	N
F	N	N	N	N	N
G	S	S	S	S	S

⁽¹⁾ Inclui o local e a coleta do folhoso oferecido picado.

⁽²⁾ Inclui o local e a coleta do folhoso oferecido não picado.

Entre as 35 coletas realizadas durante o estudo, percebe-se que em 54,3% das amostras o folhoso encontrava-se cortado.

Em muitas cozinhas a higiene, de modo geral, é tão precária que, após o corte de vegetais crus para o consumo, ocorre uma contaminação tão grande quanto antes do processo de higiene (SILVA JUNIOR, 2002).

Entre os estabelecimentos, pode-se notar que os locais B, D e G, durante as cinco coletas ofereceram a hortaliça cortada (Tabela 5).

Comparando-se os três locais que tiveram 100% das amostras coletadas com o folhoso cortado, pode-se perceber nas Figuras correspondentes que os mesmos apresentaram percentuais bem diferentes de inconformidade com os padrões microbiológicos estabelecidos para bactérias coliformes a 45°C: B (100%), D (20%) e G (20%). Desta forma pode-se considerar que o fato do vegetal estar picado não foi a única causa que levou à não conformidade dos resultados, considerando que prováveis falhas nos procedimentos de higiene e armazenamento pós-higienização, contribuíram com estes resultados.

Na Tabela 6 menciona-se a temperatura ambiente durante as cinco coletas.

Tabela 6 – Temperatura ambiente durante as coletas

Locais	Temperatura ambiente/ Local e coletas				
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a
A	35°C	30°C	30°C	25°C	25°C
B	35°C	30°C	30°C	25°C	25°C
C	35°C	30°C	30°C	25°C	25°C
D	35°C	30°C	25°C	25°C	25°C
E	35°C	30°C	30°C	25°C	20°C
F	30°C	30°C	25°C	25°C	20°C
G	30°C	30°C	25°C	25°C	20°C

Percebe-se que entre a 1^a e a 5^a coletas a temperatura ambiente manteve-se como um fator favorável (20°C - 35°C) ao desenvolvimento de bactérias mesófilas, para todos os locais de amostragem.

4.2 Coliformes totais e coliformes a 45°C

Embora não existam informações na legislação brasileira quanto aos limites de contagens toleradas para coliformes totais, tais análises foram realizadas considerando-se que os resultados positivos indicam as más condições higiênicas do local, do produto e o risco da presença de patógenos fecais.

Para o local A, as contagens de coliformes totais estiveram entre 10^2 e 10^3 NMPg⁻¹, o local B apresentou contagens entre 10^3 e 10^5 NMPg⁻¹, os locais C e D entre 10^3 e 10^4 NMPg⁻¹, local E entre 10^1 e 10^4 NMPg⁻¹, local F teve variação entre <2 e 10^4 NMPg⁻¹ e o local G apresentou contagens maiores com variações entre 10^1 e 10^6 NMPg⁻¹ (Tabela 1).

Considerando os resultados mencionados para coliformes totais, observa-se que os sete locais pesquisados apresentaram contagem elevada para tais bactérias, sendo que 31 (88,6%) amostras tiveram os níveis de contagem elevados e apenas 4 (11,4%)

apresentaram níveis reduzidos, encontrados respectivamente nos locais E, F e G com resultados que variaram entre < 2 e $8,0 \times 10^1$ NMPg⁻¹ (Tabela 1).

De acordo com os resultados das análises evidenciam-se condições higiênicas insatisfatórias, podendo-se considerar que os 7 locais praticam de forma incorreta a higienização do produto (Tabela 1).

Apesar de não existirem os padrões para contagem de coliformes totais para hortaliças *in natura*, os resultados evidenciam a higiene insatisfatória no processamento do produto, constituindo-se, com certeza, um fator de risco ao consumidor.

Para coliformes a 45°C, a ANVISA (BRASIL, 2001) estabelece o limite máximo de 10^2 NMPg⁻¹.

Do total de amostras analisadas, 14 (40%) apresentaram-se fora dos padrões estabelecidos pela legislação.

O local B teve as 5 coletas com resultados em desacordo aos padrões vigentes (Tabela 1).

Nascimento e Marques (1998), ao analisarem saladas *in natura* servidas em restaurantes, observaram que 100% das amostras pesquisadas encontravam-se fora do padrão estabelecido pela legislação para coliformes fecais, sendo encontrados valores que oscilaram de $9,3 \times 10^1$ a $4,1 \times 10^5$ NMPg⁻¹, entre os quais encontrou-se a *E. coli*.

Palú et al. (2002), em estudo de avaliação microbiológica de frutas e hortaliças frescas, servidas em restaurantes *self-service*, encontraram 12 (80,0%) das 15 amostras de hortaliças analisadas, em condições insatisfatórias. Destas, 7 ou seja, 53,3% eram amostras de alface com contagens de coliformes fecais acima do limite máximo (10^2 NMPg⁻¹), estabelecido pela ANVISA (BRASIL, 2001).

Siqueira et al. (1997), constataram que 44% das amostras de saladas cruas de restaurantes industriais apresentavam-se em condições higiênicas insatisfatórias, sendo que 7% destas encontravam-se em condição potencial de causar toxinfecção alimentar.

Damasceno et al. (2002) analisaram as condições higiênico-sanitárias de restaurantes *self-service* e de saladas cruas por eles servidas e observaram que 8,33% das amostras estavam em desacordo com a legislação em relação a *E. coli*. Este resultado, quando confrontado com outros, é considerado baixo sendo justificado pelo

elevado teor de cloro existente na água utilizada para higienização dos vegetais em todos os estabelecimentos que fizeram parte do estudo.

Em análise de alfaces coletadas em feiras livres da cidade de São Paulo, Franco e Hoefel (1983) detectaram contagem elevada de coliformes fecais entre indetectável e 10^3 NMPg⁻¹, sendo que das 34 amostras analisadas, 16 (47,1%) apresentaram-se contaminadas por *E.coli*.

Na presente pesquisa, 9 (25,7%) das amostras atingiram contaminações de 10^3 NMPg⁻¹ e 1 (2,86%) de 10^5 NMPg⁻¹ para coliformes a 45°C, evidenciando que a qualidade destas amostras esteve próxima a de um produto sem tratamento, oferecendo risco potencial ao consumidor quanto à presença de patógenos entéricos.

Considerando os resultados de coliformes totais e coliformes a 45°C, evidenciam-se condições higiênico-sanitárias precárias e portanto, a necessidade de intervenção no processo de produção, manipulação e métodos de conservação do alimento, principalmente em relação aos aspectos higiênicos.

4.3 Aeróbios mesófilos

A legislação não prevê limites para a contagem total de aeróbios mesófilos para hortaliças frescas *in natura*, portanto utilizou-se como base a recomendação de Morton (2001) para contagem de bactérias aeróbias mesófilas em vegetais congelados e similares, com valores máximos de $10^5 - 10^6$ UFCg⁻¹.

Para o estudo foi estabelecida uma especificação microbiológica com parâmetros adotados de até 10^6 UFCg⁻¹, já que na literatura são feitas várias citações de que alimentos que apresentam contagens totais de microrganismos aeróbios acima de 10^6 UFCg⁻¹ começam a apresentar sinais de deterioração (FRANCO; LANDGRAF, 2003; MORTON, 2001).

Os 7 locais estudados apresentaram contagens totais superiores ao limite de 10^6 UFCg⁻¹, com 29 (82,8%) amostras fora dos padrões adotados, estando destas 11 (37,9%) com contagens acima de 10^7 UFCg⁻¹ (Tabela 1).

Palú et al. (2002), em estudo desenvolvido com hortaliças frescas (53,3% eram amostras de alface), obtiveram elevadas contagens de bactérias aeróbias mesófilas com valores oscilando entre $2,0 \times 10^5$ UFCg⁻¹ e $2,7 \times 10^7$ UFCg⁻¹.

A presença de bactérias aeróbias mesófilas também foi relatada por Azerêdo; Conceição e Stamford (2004), com 100% das amostras de saladas cruas contaminadas com níveis de $8,0 \times 10^5$ UFCg⁻¹.

Observando os resultados obtidos nesta pesquisa, verifica-se que as amostras de alface analisadas apresentaram valores elevados na contagem de bactérias aeróbias mesófilas, indicando alta contaminação da hortaliça para o consumo, podendo atribuí-los a um produto com contaminação inicialmente alta, procedimentos de higiene insatisfatórios e condições inadequadas de temperatura de acondicionamento pós higienização e durante o período de exposição do produto no balcão de distribuição.

4.4 *Salmonella* spp

Não se detectou *Salmonella* em nenhuma das amostras de alface dos 7 locais. Tais resultados colocam as amostras analisadas de acordo com a Resolução da ANVISA (BRASIL, 2001), que estabelece para hortaliças *in natura* a ausência de *Salmonella* em 25 gramas de produto, visando a preservação da saúde pública.

Damasceno et al. (2002) avaliando as condições higiênico-sanitárias de restaurantes do tipo *self-service*, constataram a ausência de *Salmonella* em 25 gramas em amostras de saladas cruas analisadas, ressaltando terem constatado elevado teor de cloro na água de lavagem dos vegetais.

De acordo com Azerêdo; Conceição e Stamford (2004), 100% das amostras de saladas cruas analisadas em um restaurante universitário estavam dentro dos padrões exigidos pela legislação vigente, embora constatado em algumas amostras elevada contagem de aeróbios mesófilos, o que também ocorreu na presente pesquisa.

Palú et al. (2002), avaliando 15 amostras de saladas com hortaliças frescas em restaurantes *self-service*, encontraram 4 (26,7%) das saladas cruas em desacordo com a legislação para *Salmonella*, sendo destas 1 (6,7%) salada de alface.

Conforme pesquisa em amostras de saladas *in natura*, realizada por Nascimento e Marques (1998), 100% das amostras atenderam aos padrões estabelecidos pela legislação para *Salmonella*.

Considerando-se as elevadas contagens de aeróbios mesófilos encontradas nessa pesquisa, mesmo não tendo sido detectada *Salmonella*, pode-se dizer que os estabelecimentos devem se adequar às práticas de higiene e manipulação que envolvem o produto.

4.5 *Staphylococcus* coagulase positiva

A detecção de *Staphylococcus* coagulase positiva, também não prevista na legislação para este tipo de produto, foi realizada através de análises microbiológicas de contagem total em placas e posterior teste de coagulase.

Em relação a alimentos, a detecção de bactérias do grupo de *Staphylococcus* coagulase positiva é muito importante pelas seguintes razões: primeiro, porque sua presença em alimentos processados pode indicar deficiência de processamento ou condições higiênicas inadequadas do processo; segundo, porque suas enterotoxinas, uma vez presentes no alimento, poderão causar intoxicação alimentar (SILVA; GANDRA, 2004).

Embora não existam na legislação brasileira vigente padrões para *Staphylococcus* coagulase positiva para hortaliças frescas *in natura*, no que diz respeito à quantidade desses microrganismos pode-se dizer que a tolerância para alimentos, de modo geral, é de até 10^3 UFCg⁻¹, conforme a ANVISA (BRASIL, 2001).

Para a presente pesquisa adotou-se a especificação microbiológica com parâmetros baseados em padrões estabelecidos para hortaliças congeladas e similares de 10^3 UFCg⁻¹, conforme ANVISA (BRASIL, 2001). Realizando-se as análises

microbiológicas de contagem total em placas e posterior teste de coagulase, os 7 locais apresentaram resultados fora dos limites propostos para o estudo, com 21 (60%) das amostras em desacordo com aos padrões de referência.

O teste de produção de coagulase livre é considerado padrão para a identificação de *S. aureus* e o teste de produção de termonuclease também é usado como auxiliar para distinção entre *S.aureus* e outras espécies de estafilococos (BASCOMB; MANAFI, 1998).

Conforme pesquisa de Carvalho e Serafim (1996) com 44 manipuladores de alimentos de restaurante universitário, foi encontrada a presença de *S. aureus*, respectivamente em 34,7% na orofaringe e 47,8% na região nasal e nas mãos. A presença de *S. epidermidis* foi igualmente elevada aparecendo em todas as regiões estudadas.

Palú et al. (2002) observaram em seu estudo de avaliação microbiológica de frutas e hortaliças frescas de restaurantes *self-service* que do total de 30 amostras analisadas, 16 (53,3%) estavam contaminadas por *Staphylococcus aureus*, sendo que 2 (13,3%) de 15 amostras de hortaliças tratavam-se de salada de alface, as quais apresentaram cepas produtoras de enterotoxinas. Uma delas, produtora de enterotoxina A e B, sendo detectada contagem de $3,0 \times 10^2$ UFCg⁻¹ e a outra produtora de enterotoxina A com contagem de $1,1 \times 10^3$ UFCg⁻¹.

Azerêdo; Conceição e Stamford (2004) encontraram em seu estudo valores máximos de $7,0 \times 10^2$ UFCg⁻¹ em 100% das amostras coletadas de salada crua, em restaurante universitário de João Pessoa, para a bactéria *Staphylococcus aureus*.

Comparando os resultados desta pesquisa com as citações, evidencia-se que nos 7 locais em que ocorreu o estudo, o produto apresentou nível elevado de contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva, podendo ser indicativo de manipulação excessiva e inadequada além de manutenção do produto em temperaturas não recomendadas por um longo período.

A seguir são apresentados os resultados das análises microbiológicas e aspectos que envolvem as condições em que o produto era oferecido ao consumidor nos 7 locais pesquisados.

Local A

O local A serve em média 200 refeições por dia, oferecendo diversificação de pratos frios, em torno de 20 opções, sendo que destas, quatro são sempre folhosos, incluindo a alface. Os pratos frios apresentam-se dispostos em balcão de distribuição refrigerado com temperatura de 8°C, adequada de acordo com as recomendações da Portaria CVS-6 (SÃO PAULO, 1999), considerando condutas e critérios para distribuição de alimentos frios, sendo o máximo de 10°C por até 4 horas.

As coletas foram realizadas em datas e horários diferenciados, incluindo o início, meio e final do período de distribuição (Tabelas 2 e 3).

Entre as coletas, em três delas o folhoso foi coletado já picado, enquanto que em outras duas a alface encontrava-se em folhas inteiras (Tabela 5).

Durante as cinco coletas percebeu-se que o funcionário responsável pela pesagem dos pratos e reposição das preparações junto ao balcão, tanto para o local A quanto para os locais B, C, D, E e G, usava avental fechado de cor branca, proteção para os cabelos, sapatos fechados e não usava adornos, atendendo requisitos propostos pela Portaria CVS-6 (SÃO PAULO, 1999). No local F, tal funcionário não fazia o uso de proteção para os cabelos, o que coloca o local em desacordo com a legislação.

As Figuras 8, 9 e 10 mostram os percentuais de amostras em acordo e em desacordo com os padrões microbiológicos para o local A.

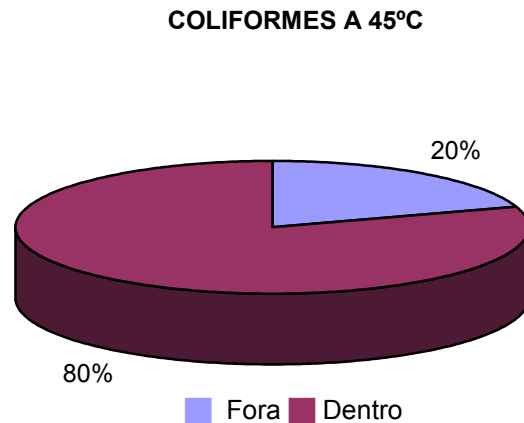


Figura 8 – Percentual de amostras em acordo e em desacordo comparados ao limite permitido pela RDC nº 12 de 02.01.01, referente ao NMPg⁻¹ de coliformes a 45°Cg⁻¹

O percentual de 20% de análises fora dos padrões microbiológicos para coliformes a 45°C e a contagem de coliformes totais entre $2,2 \times 10^2$ e $5,4 \times 10^3$ UFCg⁻¹ indicam que os procedimentos higiênico-sanitários foram insatisfatórios para o produto. O percentual de 20% resultou da 3ª coleta, realizada no horário das 11h30min, com número de 35 pessoas no local (Tabelas 2, 3, 4), em dia de temperatura ambiente de 27°C, sem chuvas nos dias que antecederam a coleta, estando a verdura neste dia cortada (Tabela 5).

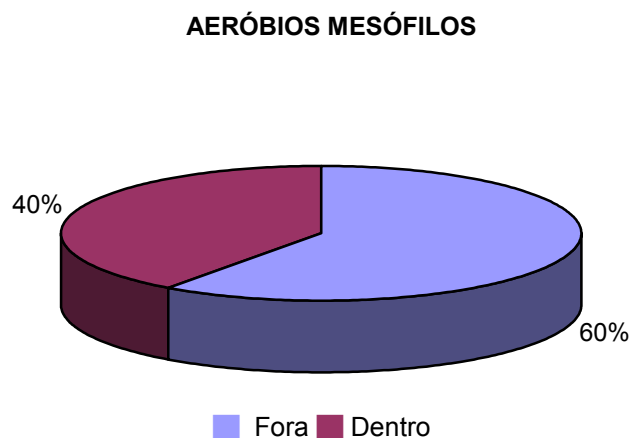


Figura 9 – Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente à contagem total em placas para aeróbios mesófilos

Para aeróbios mesófilos, 3 (60%) amostras estiveram fora da especificação microbiológica, resultantes das 1ª, 2ª e 5ª coletas, sendo que a 1ª e a 5ª coletas foram feitas bem próximas do horário de abertura do estabelecimento, indicando que, pela alta contagem, provavelmente o produto tenha ficado exposto à temperatura ambiente anteriormente à distribuição, ou que o mesmo já tenha vindo com alta contaminação bacteriana e que os procedimentos de higienização não surtiram o efeito desejado.

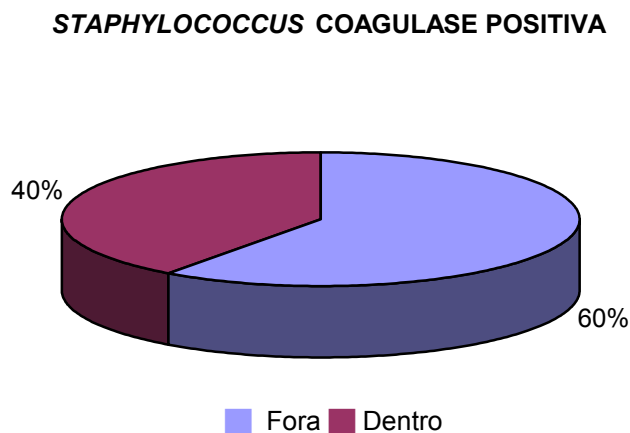


Figura 10 – Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente a *Staphylococcus coagulase positiva*

Para *Staphylococcus coagulase positiva* 3 (60%) das amostras estavam fora dos parâmetros estabelecidos, sendo as 2ª, 4ª e 5ª coletas. As 2ª e 4ª coletas foram realizadas com cerca de 1 hora após a abertura do local. Na 2ª coleta o folhoso encontrava-se cortado, fato que associado ao tempo de exposição no balcão pode ter contribuído para a alta contagem dessas bactérias.

Os percentuais encontrados fora dos limites microbiológicos para as bactérias em estudo indicam a necessidade de intensificação nos procedimentos higiênico-sanitários para o produto e melhor acondicionamento em temperaturas adequadas.

Local B

O local B oferece em média 150 refeições por dia, com pratos frios diversificados, acondicionados em balcão de distribuição refrigerado com temperatura de 8°C, oferecendo cerca de 10 opções, incluindo dois folhosos por dia.

As coletas foram realizadas em horários alternados com o intuito de realizar o rodízio de horários entre as cinco coletas, permitindo resultados de coletas próximas ao início e final da distribuição. Estes horários estiveram entre 11h10min e 12h15min, com números de refeições de 2 a 16 pessoas no momento da coleta (Tabelas 3 e 4).

Durante as cinco coletas o local sempre ofereceu o folhoso cortado/picado (Tabela 5).

Nas Figuras 11, 12 e 13 estão representadas as amostras em acordo e em desacordo aos padrões microbiológicos para o local B.

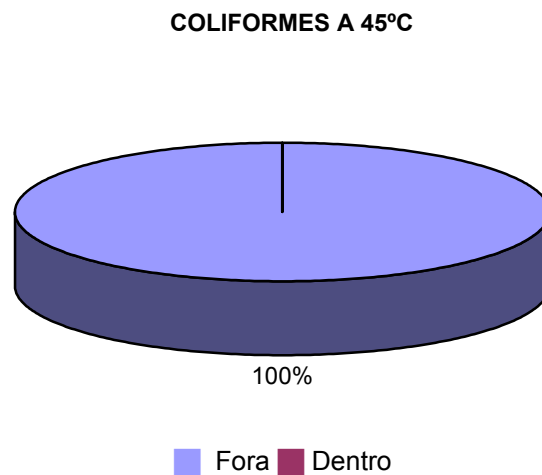


Figura 11 – Percentual de amostras em acordo e em desacordo comparados ao limite permitido pela RDC nº 12 de 02.01.01, referente ao NMPg⁻¹ de coliformes a 45°Cg⁻¹

Os resultados das 1^a, 2^a e 3^a coletas em relação aos coliformes totais tiveram contagens de 10³ NMPg⁻¹, a 4^a coleta de 10⁵ NMPg⁻¹ e a 5^a coleta de 10⁴ NMPg⁻¹ (Tabela1), ou seja, bastante elevadas.

O percentual de 100% de análises fora dos padrões microbiológicos para coliformes a 45°C indica que os procedimentos higiênico-sanitários foram falhos e ainda um agravante que é o fato de se cortar o vegetal, processo que dependendo da precariedade da higiene do local, leva a uma contaminação tão grande quanto a anterior ao processo de higiene, conforme Silva Junior, 2002.



Figura 12 – Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente à contagem total em placas para aeróbios mesófilos

O percentual de 100% de análises fora da especificação microbiológica para aeróbios mesófilos indica que provavelmente houve falhas no processo de higienização associado ao armazenamento inadequado anteriormente à distribuição, visto que o local mantém a hortaliça em balcão refrigerado, com temperatura de 8°C.

STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA

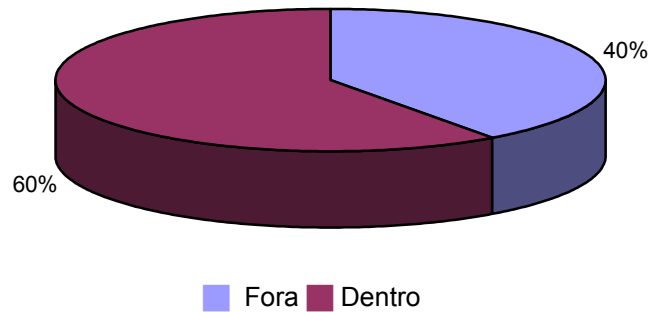


Figura 13 – Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente a *Staphylococcus coagulase positiva*

Entre as coletas, 2 (40%) apresentaram contagem elevada para *Staphylococcus coagulase positiva*. Este percentual resultou das 1ª e 5ª coletas, realizadas com aproximadamente 45 minutos após a abertura do local.

O percentual apurado das análises indica que o local B realiza de modo inadequado os procedimentos de higiene do produto. O fato de servir o folhoso sempre cortado pode ter agravado as condições microbiológicas do produto quando comparado aos demais locais. Portanto tornam-se urgentes melhores condições de higiene e sanificação para que a contaminação detectada no local seja reduzida e o produto esteja adequado ao consumo.

Local C

O local C oferece em média 150 refeições por dia, também possui pratos frios diversificados, sendo saladas preparadas com molhos diversos, acondicionadas em balcão refrigerado a 8°C, oferecendo cerca de 10 opções. Entre os pratos frios são oferecidos todos os dias dois tipos de folhosos, os quais ficam fora do acondicionamento refrigerado, colocados apenas sobre o balcão de distribuição, em temperatura ambiente e sem proteção (Tabela 6).

Nas cinco coletas realizadas no local, o folhoso alface sempre foi oferecido em folhas inteiras, assim como o outro folhoso, normalmente rúcula, também servido em folhas inteiras.

As coletas foram realizadas em horários diferentes, entre 11h25min e 12h15min, conforme a Tabela 3. No decorrer destes horários constatou-se a presença de 2 a 20 pessoas no local (Tabela 4).

Nas Figuras 14, 15 e 16 encontram-se representadas as condições de conformidade e não conformidade das amostras em relação aos padrões microbiológicos para o local C.

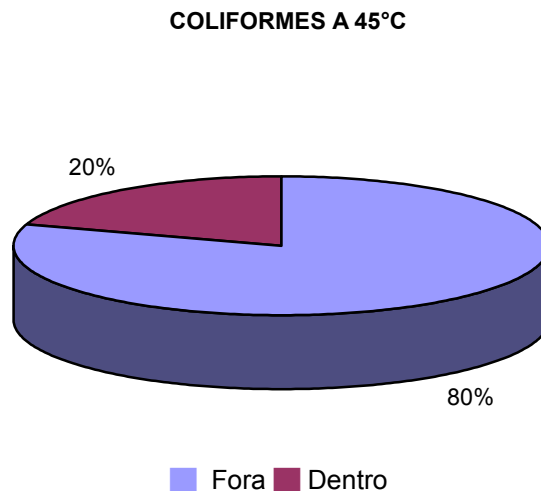


Figura 14 – Percentual de amostras em acordo e em desacordo comparados ao limite permitido pela RDC nº 12 de 02.01.01, referente ao NMPg^{-1} de coliformes a 45°Cg^{-1}

As análises para coliformes totais apresentaram resultados nas 1ª e 4ª coletas de 10^4NMPg^{-1} e nas 2ª, 3ª e 5ª coletas de 10^3NMPg^{-1} (Tabela 1).

O percentual das análises para coliformes a 45°C foi de 4 (80%) das amostras fora do padrão microbiológico, estabelecido pela ANVISA (BRASIL, 2001).

As altas contagens, tanto para coliformes totais quanto para coliformes a 45°C , evidenciam práticas incorretas de higiene. Em nenhuma das coletas encontrou-se o vegetal cortado (Tabela 5).

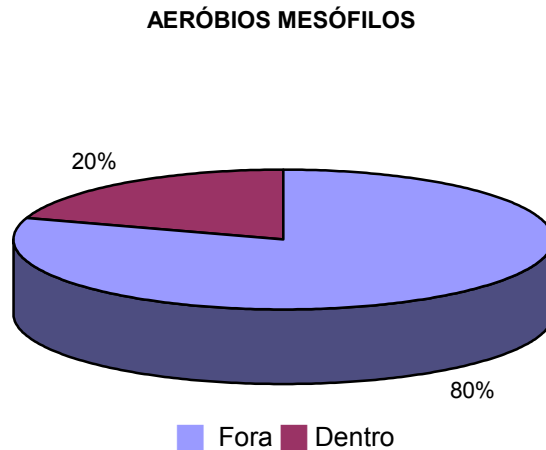


Figura 15 – Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente à contagem total em placas para aeróbios mesófilos

Para a contagem de aeróbios mesófilos, 4 (80%) amostras analisadas estiveram fora da especificação microbiológica adotada para o estudo.

Destaca-se para o local C a gravidade do produto ser oferecido totalmente fora das condições adequadas de temperatura, conforme as recomendações da Portaria CVS-6 (SÃO PAULO, 1999) a qual indica a temperatura de até 10°C para distribuição de alimentos frios e também o fato de ser sempre apresentado em recipientes de tamanho relativamente grande, o que diminui o número de reposições do folhoso no balcão.

STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA

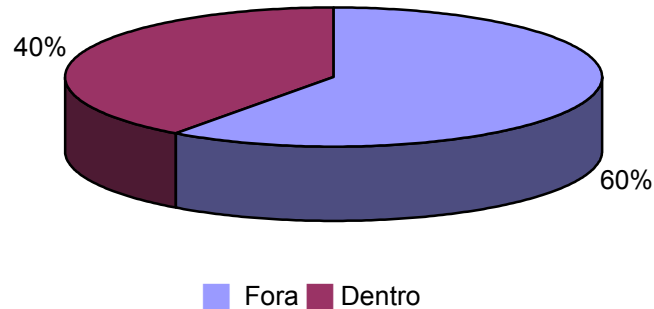


Figura 16 – Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente a *Staphylococcus coagulase positiva*

Considerando a especificação microbiológica de 10^3 UFCg⁻¹ para *Staphylococcus coagulase positiva* neste estudo, 3 (60%) das amostras não atenderam ao padrão adotado, sendo representadas através das 1^a, 4^a e 5^a coletas, com o produto coletado cerca de 45 minutos após a abertura do local para o consumo.

O quadro de resultados obtidos indica que o local precisa melhorar os métodos de higiene e acondicionar o folhoso em balcão refrigerado, conforme as orientações da Portaria CVS-6 (SÃO PAULO, 1999) durante a distribuição, visando reduzir as altas contagens de bactérias mesófilas e *Staphylococcus coagulase positiva*, além de oferecer o folhoso em recipientes menores para proporcionar rápido consumo, possibilitando as reposições e menor risco de contaminação.

Local D

O local D oferece em média 80 refeições por dia entre consumo no local e distribuição de refeições individuais, os chamados “marmitex” ou a granel.

Cerca de cinco pratos frios são oferecidos diariamente, entre eles os folhosos, incluindo sempre a alface. Os mesmos são acondicionados em balcão refrigerado

através de placas de gelo, podendo considerar que a temperatura estivesse também em torno de 8°C, porém o termostato não se encontrava exposto.

Durante as cinco coletas, o folhoso encontrava-se cortado (Tabela 5).

O horário de abertura do local iniciava-se a partir das 11h30min e as coletas sempre iniciaram a partir deste horário. O rodízio de horários foi compreendido entre 11h30min e 12h20min, observando-se de 1 a 2 pessoas no local (Tabelas 3 e 4).

Os folhosos eram oferecidos pelo local em recipientes com quantidades pequenas, dificultando coletas mais próximas ao final da distribuição.

As Figuras 17, 18 e 19 apresentam os percentuais de amostras em acordo e em desacordo com os padrões microbiológicos propostos para o estudo.

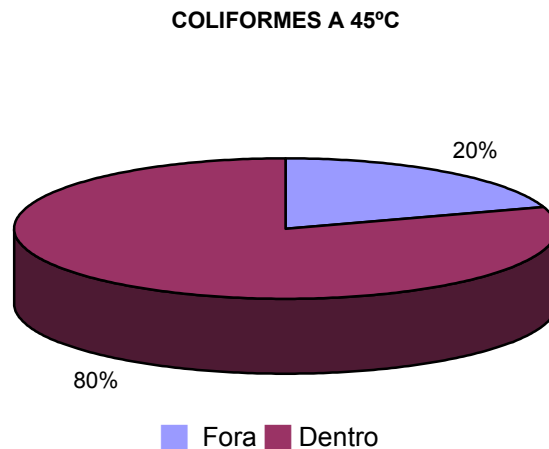


Figura 17 – Percentual de amostras em acordo e em desacordo comparados ao limite permitido pela RDC nº 12 de 02.01.01, referente ao NMPg^{-1} de coliformes a 45°Cg^{-1}

As análises para coliformes totais apresentaram resultados com contagens nas 1ª, 3ª e 5ª coletas de 10^3 NMPg^{-1} e nas 2ª e 4ª coletas contagens de 10^4 NMPg^{-1} (Tabela 1). Embora as cinco coletas tenham apresentado níveis elevados para coliformes totais, indicando a necessidade de adequação nas práticas higiênicas, os índices de contaminação fecal foram adequados em 4 (80%) das amostras, conforme ANVISA (BRASIL, 2001).

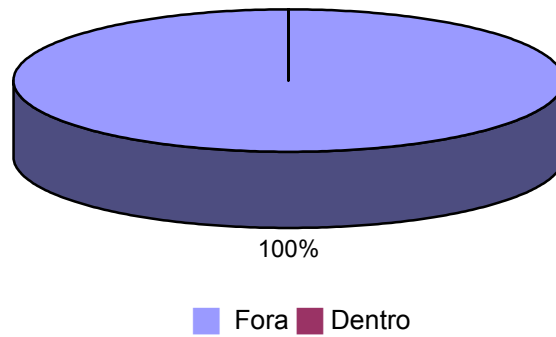
AERÓBIOS MESÓFILOS

Figura 18 – Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente à contagem total em placas para aeróbios mesófilos

Os resultados das análises em relação à especificação microbiológica para aeróbios mesófilos ficaram fora dos padrões nas 5 (100%) amostras, indicando a necessidade de melhor higienização do produto e/ou maiores cuidados no armazenamento do vegetal após a higienização.

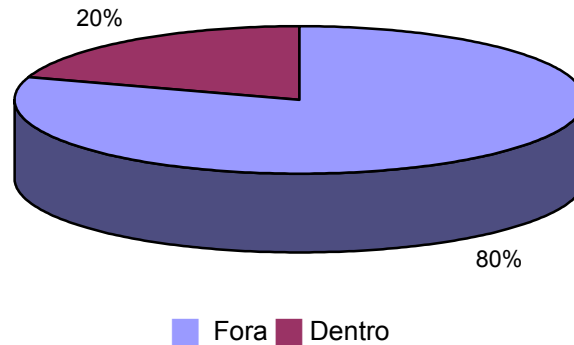
STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA

Figura 19 – Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente a *Staphylococcus coagulase positiva*

Entre as 5 coletas, o local D apresentou apenas 1 (20%) das amostras em conformidade ao padrão microbiológico para *Staphylococcus coagulase positiva*, decorrente da 2ª coleta, realizada às 11h30min, logo na abertura do local, quando no momento havia 1 pessoa se servindo no balcão.

Com exceção da 1ª coleta, realizada às 12h20min, as demais ocorreram praticamente no horário de abertura, com números de pessoas no local também igual ao da 2ª coleta.

Nas cinco coletas, o folhoso foi oferecido cortado, fato que pode ter induzido a contaminação bacteriana, em função da maior manipulação.

De acordo com os resultados apresentados pelo local D, pode-se dizer que há falhas no controle de temperatura adequada para o vegetal anteriormente à distribuição, devendo ainda reduzir a prática de oferecer o produto cortado, diminuindo o risco de contaminação, bem como checar a eficácia do processo de higienização do produto.

Local E

O local E oferece em média 100 refeições por dia entre consumo no local e refeições do tipo “marmitex”.

São oferecidas seis opções de pratos frios. O balcão de distribuição para os mesmos não é refrigerado, permanecendo os pratos frios em temperatura ambiente, conforme Tabela 6. Durante as coletas pôde-se perceber que os recipientes que mantêm a hortaliça são de tamanhos pequenos o que torna a reposição mais constante. Durante duas coletas foi possível presenciar a reposição da hortaliça no balcão e perceber que as mesmas estavam armazenadas sob refrigeração, estimando-se temperatura inferior a 10°C, percebida através do contato com a embalagem.

Durante as coletas foi realizado o revezamento de horários, que ficou entre 11h05min e 12h25min, percebendo-se fluxo de 4 a 16 pessoas, nos diferentes horários (Tabelas 3).

Nas figuras 20, 21 e 22 estão representados os resultados das análises do Local E, obtidos durante a presente pesquisa.

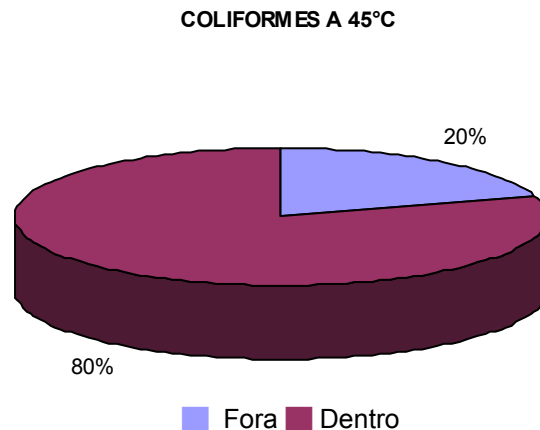


Figura 20 – Percentual de amostras em acordo e em desacordo comparados ao limite permitido pela RDC nº 12 de 02.01.01, referente ao NMPg⁻¹ de coliformes a 45°Cg⁻¹

As análises para coliformes totais tiveram resultados variando entre as coletas, ou seja, na 1ª coleta contagem de 10³NMPg⁻¹, nas 2ª, 3ª e 4ª coletas de 10⁴NMPg⁻¹ e

na 5ª coleta contagem de 10^1NMPg^{-1} . Considerando estes valores, conclui-se que a higienização do produto é feita de modo incorreto.

Em relação à contaminação fecal, o local teve 1 (20%) das amostras em desacordo com a ANVISA (BRASIL, 2001), decorrente da 3ª coleta realizada no horário das 12h25min, com 15 pessoas no local.

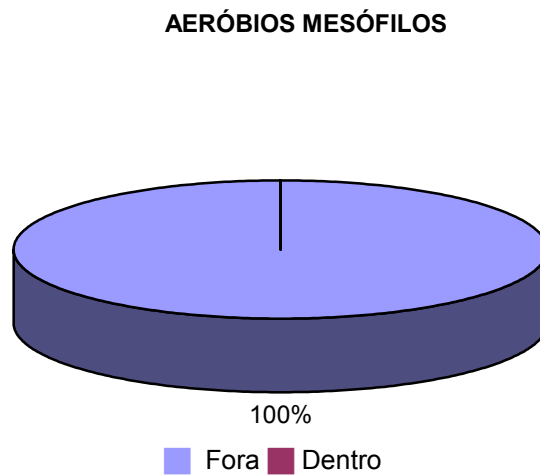


Figura 21 – Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente à contagem total em placas para aeróbios mesófilos

Quanto aos padrões microbiológicos estabelecidos para contagem total de aeróbios mesófilos, o local E apresentou as 5 (100%) amostras em desacordo ao limite proposto para o estudo, mostrando que deve-se manter o produto sob temperatura adequada, durante o período de exposição, bem como monitorar o processo de higienização.

STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA

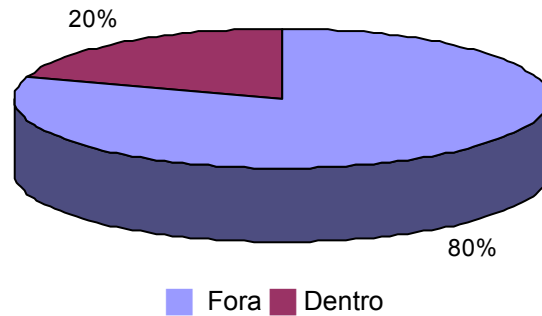


Figura 22 – Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente a *Staphylococcus coagulase positiva*

Entre as 5 coletas realizadas no local E apenas 1 (20%) das amostras esteve dentro dos padrões microbiológicos propostos pelo estudo, fato que pode ser atribuído à pequena área de circulação, permitindo a aglomeração das pessoas ao redor do balcão de distribuição, à falta de proteção para o mesmo, assim como à falta de refrigeração durante a exposição.

O local E encontrava-se inadequado em relação aos critérios de distribuição dos pratos frios, acontecendo em temperatura ambiente. Conforme Portaria CVS-6 (SÃO PAULO, 1999) os alimentos frios expostos ao consumo imediato devem ser distribuídos no máximo a 10°C por até 4 horas, para que não ocorra multiplicação microbiana e estejam protegidos de novas contaminações.

Local F

O local oferece F aproximadamente 100 refeições por dia, distribuídas no local.

As seis opções de pratos frios eram expostas em balcão refrigerado a uma temperatura de 8°C.

Os horários de coletas mantiveram-se entre 11h15min e 12h25min, com clientes entre 3 e 8 pessoas (Tabelas 3 e 4).

As Figuras 23, 24 e 25 representam os valores obtidos nas análises microbiológicas para o local F.

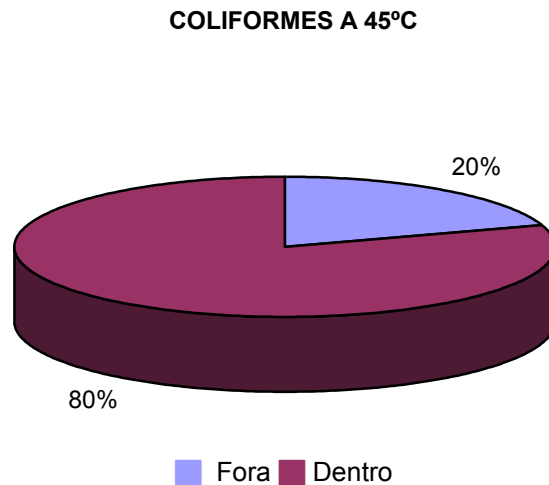


Figura 23 – Percentual de amostras em acordo e em desacordo comparados ao limite permitido pela RDC nº 12 de 02.01.01, referente ao NMPg^{-1} de coliformes a 45°Cg^{-1}

As análises para coliformes totais resultaram em contagens que variaram entre as coletas, sendo que nas 1ª e 2ª coletas foram obtidas contagens de 10^4 NMPg^{-1} , na 3ª de 10^1 NMPg^{-1} , na 4ª coleta contagem $< 2 \text{ NMPg}^{-1}$ e na 5ª de 10^2 NMPg^{-1} . As contagens encontradas em 3 das 5 coletas foram baixas considerando-se que alguns aspectos positivos estavam envolvidos, como: higienização adequada, boa qualidade da água utilizada na higienização e adequado armazenamento anterior à distribuição.

O percentual para coliformes a 45°C ficou fora do padrão proposto pela legislação em apenas 1 (20%) das amostras coletadas.

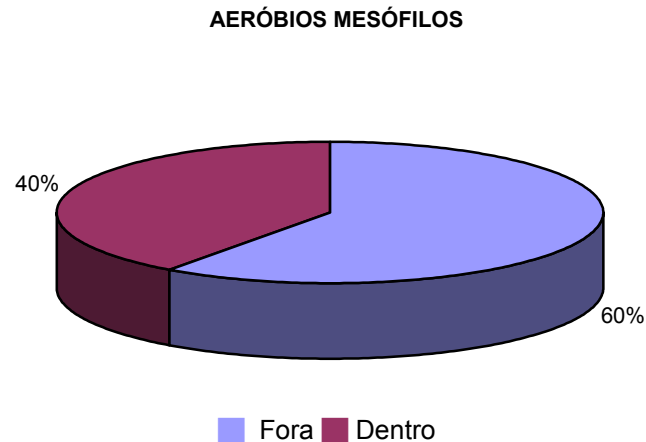


Figura 24 – Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente à contagem total em placas para aeróbios mesófilos

Quanto aos resultados para aeróbios mesófilos, 3 (60%) amostras apresentaram-se fora dos padrões estabelecidos para o estudo, sendo resultantes das 1^a, 2^a e 5^a coletas. Os horários de coleta estiveram entre 11h10min e 12h45min. A coleta de maior contagem bacteriana foi a 1^a, realizada após 01h45min da abertura do local.

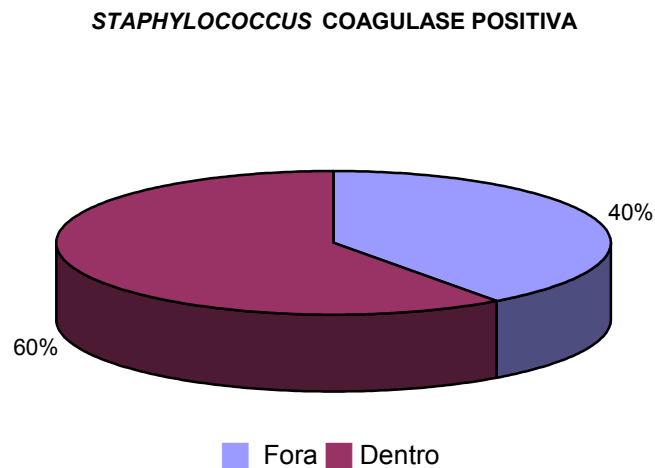


Figura 25 – Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente a *Staphylococcus* coagulase positiva

Para *Staphylococcus* coagulase positiva, o local teve 3 (60%) das 5 coletas de acordo com a especificação adotada para o estudo.

O local F deve procurar atender às normas da legislação, conforme a Portaria CVS-6 (SÃO PAULO, 1999) quanto ao uso do uniforme adequado para os funcionários e implementar os procedimentos higiênico-sanitários para adequar-se aos padrões microbiológicos em relação aos coliformes a 45°C. Deve também melhorar os critérios de temperatura a fim de conseguir reduzir a contaminação por aeróbios mesófilos e *Staphylococcus* coagulase positiva.

Local G

O local G oferece aproximadamente 100 refeições por dia entre o consumo no local e comercialização de refeições do tipo “marmitex”.

Entre as seis opções de pratos frios, duas delas são de folhosos, sendo oferecidas em balcão refrigerado em temperatura de 8°C.

Os horários das coletas ocorreram entre 11h10min e 12h20min e nas 05 coletas o folhoso foi oferecido já cortado (Tabelas 3 e 5).

Entre as coletas, a frequência da clientela teve variação de 3 a 8 pessoas (Tabela 4).

O local G, assim como o local B, ofereceu em todas as coletas o folhoso cortado.

As Figuras 26, 27 e 28, ilustram os resultados das análises microbiológicas do local G.

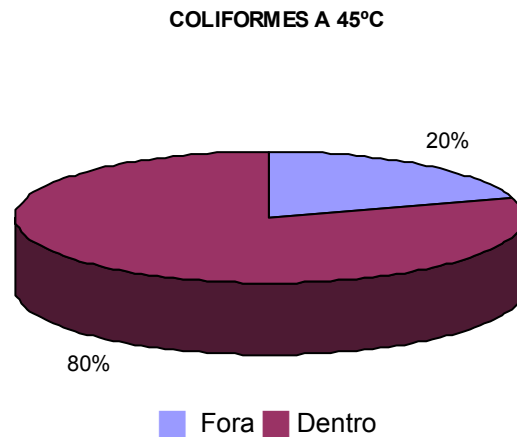


Figura 26 – Percentual de amostras em acordo e em desacordo comparados ao limite permitido pela RDC nº 12 de 02.01.01, referente ao NMPg⁻¹ de coliformes a 45°Cg⁻¹

As análises para coliformes totais tiveram resultados extremos, pois na 3^a coleta a contagem foi de $1,6 \times 10^6$ NMPg⁻¹, enquanto que na 5^a coleta a contagem foi de $1,7 \times 10^1$ NMPg⁻¹. As 1^a, 2^a e 4^a coletas tiveram contagens de 10^3 NMPg⁻¹ (Tabela 1), considerando desta forma que o local precisa padronizar os procedimentos de higiene.

O percentual de análises para coliformes a 45°C teve 1 (20%) das amostras fora dos limites estabelecidos pela legislação, sendo este percentual obtido na 3^a coleta.

O local G, da mesma forma que os locais B e D, apresentou sempre a hortaliça alface picada para ser servida ao público e as análises mostraram resultados bem mais satisfatórios em contrapartida daquelas encontradas para os outros dois locais. Assim, somente a manipulação maior para picar o produto, além da maior exposição dos tecidos internos ao ar e provável contaminação não justificam as maiores contaminações nos locais B e D. Outros fatores como melhor higienização e condições de armazenamento e distribuição, com certeza, têm um papel importante no controle da proliferação microbiana.

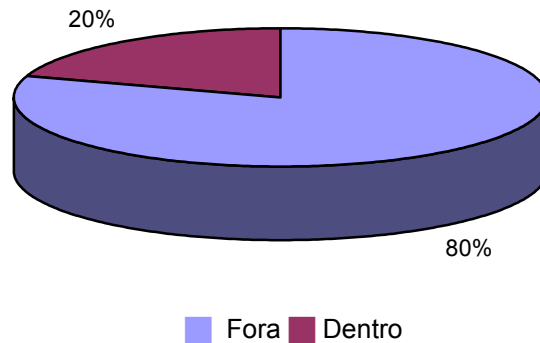
AERÓBIOS MESÓFILOS

Figura 27 – Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente à contagem total em placas para aeróbios mesófilos

Quanto aos resultados das análises para aeróbios mesófilos, os resultados mostraram 4 (80%) das amostras fora da especificação estabelecida para o estudo. Este resultado foi obtido nas 1^a, 2^a, 3^a e 4^a coletas, tanto em horários próximos à abertura do local quanto por volta de uma hora após a abertura, o que indica a necessidade de melhor acondicionamento sob refrigeração e melhor higienização.

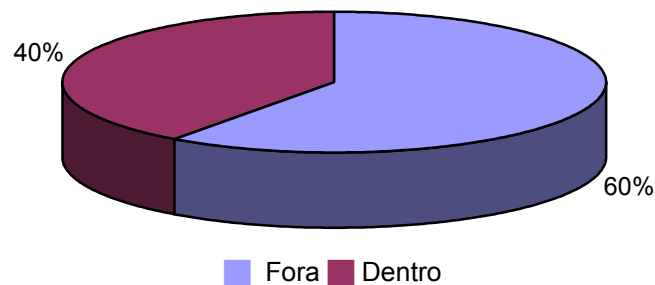
STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA

Figura 28 – Percentual de amostras com resultados em acordo e em desacordo comparados ao limite da especificação microbiológica adotada para o estudo, referente a *Staphylococcus coagulase positiva*

De acordo com os resultados para *Staphylococcus* coagulase positiva, 3 (60%) amostras estiveram fora dos limites propostos para o estudo. Este resultado foi obtido nas 3^a, 4^a e 5^a coletas, em horários próximos à abertura do local e também com 1h20min após a abertura, indicando a necessidade de correção nos critérios de temperatura adotados no acondicionamento do produto e diminuição da incidência de vegetal cortado, buscando reduzir a manipulação.

Devido as grandes variações nas contagens microbianas encontradas, nas amostras analisadas dos 7 locais amostrados, pode-se admitir que há falhas na padronização dos procedimentos higiênicos, problemas no manuseio pós-colheita e/ou no armazenamento anterior à distribuição, rotatividade de fornecimento do vegetal, problemas na qualidade da água de irrigação do produto, ou seja, hipóteses que podem justificar a causa de um alto índice de contaminação, refletindo nos resultados das análises do produto.

Como colocado, são hipóteses a serem consideradas, uma vez que não foi feito um monitoramento dessas etapas para uma avaliação que tornasse possível apontar, de fato, a(s) causa(s) das altas porcentagens de amostras com contagens microbianas elevadas ($> 10^3$ UFCg⁻¹ de *Staphylococcus* coagulase positiva e $> 1,0 \times 10^6$ UFCg⁻¹ de bactérias mesófilas totais), além das porcentagens de amostras que se apresentam com valores de coliformes a 45°C acima dos padrões microbiológicos legais vigentes ANVISA (BRASIL, 2001).

A Figura 29 apresenta os percentuais de adequação dos 7 estabelecimentos, considerando os resultados das análises microbiológicas para as bactérias pesquisadas.

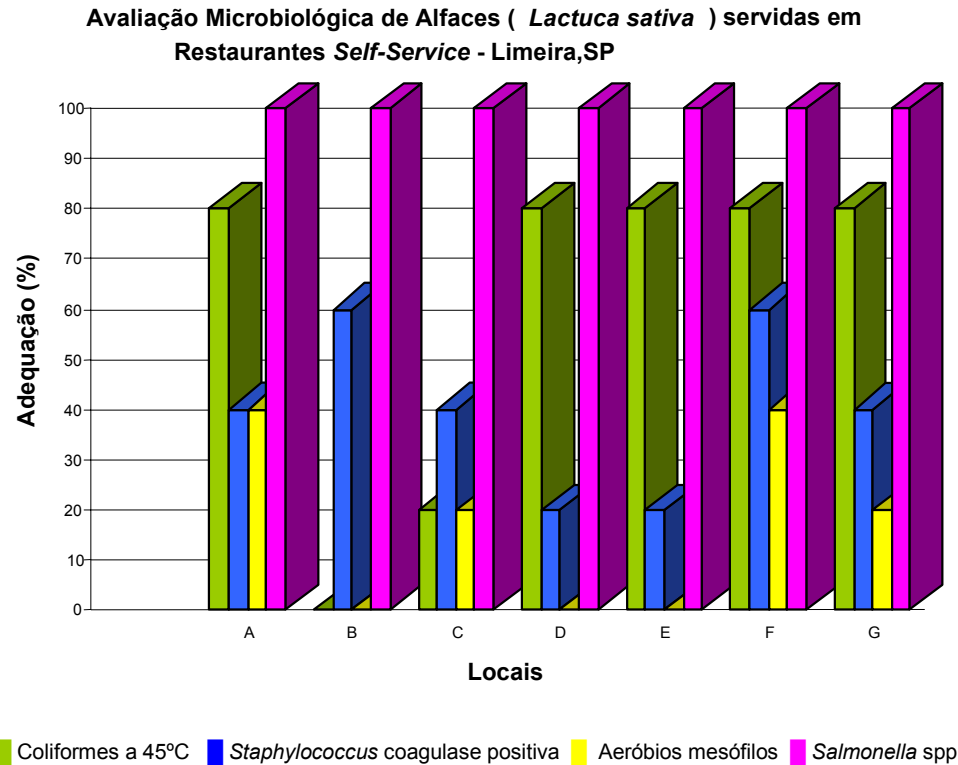


Figura 29 - Percentual de adequação dos resultados das análises microbiológicas apresentados pelos 07 locais, envolvidos no estudo

Observando a Figura 29, as amostras que apresentaram melhores condições microbiológicas e, portanto, em melhores condições para o consumo humano, considerando-se apenas os parâmetros microbiológicos, foram coletadas no local F.

Tabela 7 - Coeficiente de variação (%)

Microrganismos	A	B	C	D	E	F	G
Coliformes Totais	86,86	200,14	28,25	11,74	115,54	138,22	221,31
Coliformes a 45°C	201,77	164,72	131,51	189,31	188,23	223,60	219,93
<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	80,77	180,29	107,86	66,02	73,63	142,94	83,24
Aeróbios mesófilos	124,40	112,81	109,92	40,50	114,98	112,83	92,27

A análise da variância apresentou um elevado coeficiente de variação entre as 35 amostras analisadas para os microrganismos estudados.

O alto grau de variação entre as amostras indica que as condições microbiológicas das mesmas não apresentaram uniformidade no decorrer das análises.

A variação na contaminação por microrganismos pode ser justificada por diversos fatores como: produto altamente contaminado, higienização inadequada e armazenamento incorreto do produto pós processamento.

Tabela 8 – Comparativo entre os locais através da média, segundo as variáveis: coliformes totais, coliformes a 45°C, aeróbios mesófilos e *Staphylococcus coagulase* positiva

Locais	Coliformes totais NMPg ⁻¹	Coliformes 45°C NMPg ⁻¹	<i>Staphylococcus coagulase</i> positiva UFCg ⁻¹	Aeróbios mesófilos UFCg ⁻¹
A	3,1743 a	1,9810 ab ⁽¹⁾	3,1578 a	6,4508 a
B	4,3933 a	4,0468 a	3,1704 a	6,5516 a
C	4,0483 a	2,2007 ab	3,4378 a	6,6054 a
D	3,9107 a	0,8939 b	3,4954 a	7,0065 a
E	3,6822 a	0,8907 b	3,2299 a	6,6618 a
F	2,4452 a	0,5398 b	2,5348 a	6,1943 a
G	3,6585 a	1,5416 ab	3,3212 a	6,8659 a

⁽¹⁾ Médias de locais seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 0,05 de probabilidade.

De acordo com a Tabela 8, o local B apresentou a maior média entre os locais para bactérias coliformes a 45°C, comprovando os resultados anteriores à análise estatística.

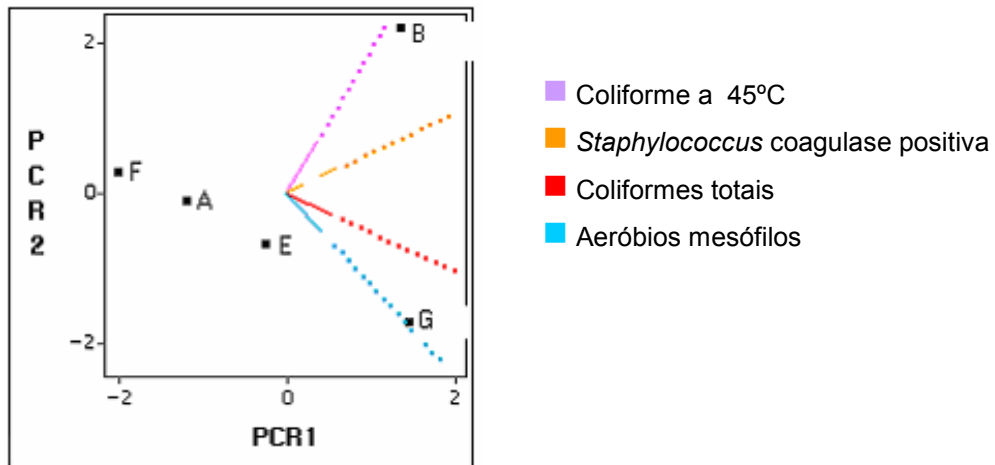


Figura 30 – Gráfico biplot das condições microbiológicas dos locais em relação aos microrganismos estudados

Através da análise Biplot, Gabriel (1971), os locais A e F mostraram os menores valores nas contagens de coliformes totais, o local E mostrou-se o de melhor adequação aos padrões microbiológicos para coliformes a 45°C, o local B apresentou alta prevalência de bactérias coliformes a 45°C, conforme já demonstrado em resultados anteriores, o local F teve as menores contagens para *Staphylococcus coagulase positiva* e o local G apresentou as maiores contagens para aeróbios mesófilos quando comparados entre si.

A variação na contaminação por microrganismos entre os locais pode ser justificada por fatores associados à manipulação, à estrutura física e à temperatura de armazenamento anterior e posterior à higienização.

4.6 Análises microbiológicas realizadas com amostras após desinfecção no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da ESALQ

Complementando o estudo, foram realizadas análises microbiológicas com o produto submetido à desinfecção, segundo Leitão et al. (1981); Portaria CVS-6 (SÃO PAULO, 1999) e Silva Junior (2002).

Como as análises microbiológicas para *Salmonella* tiveram resultados negativos no produto coletado diretamente dos estabelecimentos, para os testes com as amostras submetidas à desinfecção, o referido microrganismo não foi analisado, sendo realizadas as análises para coliformes totais, coliformes a 45°C, contagem total de aeróbios mesófilos e *Staphylococcus* coagulase positiva.

Na Tabela 9, estão representados os resultados obtidos nas análises microbiológicas do produto após a desinfecção.

Tabela 9 - Resultados das análises microbiológicas do produto após desinfecção no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da ESALQ

Locais	Microrganismos				
	Coliformes Totais NMPg ⁻¹	Coliformes a 45°C NMPg ⁻¹	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva UFCg ⁻¹	Aeróbios mesófilos UFCg ⁻¹	Coletas
A	2,3X10 ²	<2	1,6X10	0,3X10	5 ^a
B	7,0X10 ²	<2	0,4X10	0,6X10	4 ^a
C	4,9X10 ²	<2	6,2X10 ²	0,4X10	5 ^a
D	1,1X10 ²	<2	1,0X10	1,3X10	5 ^a
E	<2	<2	1,1X10	0,3X10	5 ^a
F	<2	<2	1,1X10	1,8X10	5 ^a
G	4,6X10 ²	<2	0,5X10	1,1X10	4 ^a

Comparando os resultados das análises dos produtos do mesmo lote, porém submetidos à desinfecção, percebe-se que houve reduções consideráveis na contagem dos microrganismos.

Para coliformes totais, a contagem regrediu para 10²NMPg⁻¹ e < 2NMPg⁻¹, com variações de 80% a 99% de redução; para coliformes a 45°C, o decréscimo atingiu 99%; para *Staphylococcus* coagulase positiva de 84% a 99% e para aeróbios mesófilos de 80% a 98%, valores que tornam o produto seguro para o consumo humano em relação aos parâmetros microbiológicos analisados.

Fica claro que, pelos resultados obtidos no teste de desinfecção, se a alface foi submetida ao processo de desinfecção no local de preparo e oferta (restaurantes), o procedimento não foi executado de maneira satisfatória, uma vez que, com a

desinfecção no Laboratório de Microbiologia da ESALQ - USP, os mesmos lotes que haviam mostrado contaminações elevadas nas determinações microbiológicas realizadas, apresentaram reduções muito altas nessas contagens, muitas vezes atingindo reduções de 98-99%.

Estudos semelhantes à presente pesquisa, envolvendo a sanificação de hortaliças, foram desenvolvidos mostrando o efeito do cloro e do vinagre na redução de patógenos.

Beuchat et al (1998), utilizando concentrações de 50 a 200ppm de cloro para sanitizar frutas e vegetais frescos, bem como produtos minimamente processados em escala comercial, submetem a alface a uma concentração de 200ppm de cloro por 10 minutos com posterior enxágüe, atingindo resultados de mais de 98% de redução na contaminação de aeróbios mesófilos.

Concentrações maiores de cloro foram avaliadas por Garg; Churey e Splittstoesser (1990), em hortaliças sanitizadas em solução contendo 300mgL^{-1} de cloro livre. Esses autores observaram uma redução de três ciclos logarítmicos na contagem de bactérias em folhas de alface, mas o efeito não foi observado em outras hortaliças, como cenouras e repolho roxo.

Concentrações elevadas de cloro foram implicadas como causa de descoloração de frutas e vegetais, aumento da corrosão de equipamentos, e responsáveis por formar cloraminas voláteis que representam risco à saúde dos trabalhadores, por provocarem irritações na pele e nos pulmões (HURST, 1995).

Park e Lee (1995) encontraram que concentrações altas de cloro promoveram diminuição na contagem padrão de microrganismos em agrião fresco, porém houve perda significativa da qualidade da hortaliça quando essa foi tratada com 300mgL^{-1} ou mais de cloro. Além disso, tratamentos impróprios à base de cloro podem não eliminar patógenos, como por exemplo a *Listeria monocytogenes* (BRACKETT, 1987).

Observações de Porto (2001) obtidas a partir de estudo realizado com amostras de alface intencionalmente contaminadas por *L. monocytogenes* e posteriormente submetidas ao tratamento com agentes sanificantes à base de cloro, mostraram que o dicloroisocianurato de sódio foi o que apresentou melhor eficiência na redução deste microrganismo.

Entani et al. (1998), estudaram o efeito do ácido acético (2,5%), obtendo reduções que foram de $2,0 \times 10^6$ UFCmL⁻¹ a $< 2,0 \times 10^1$ UFCmL⁻¹, na população de *E.coli* O 157:H7.

Eiroa e Porto (1996) avaliaram a eficiência do vinagre a 6% em alfaces e obtiveram reduções de 5 ciclos logarítmicos contra o *Vibrio cholerae*, não sendo obtido resultado semelhante para coliformes totais, coliformes fecais e aeróbios mesófilos.

Leitão et al. (1981) observaram a redução de 99,9% da microflora bacteriana contaminante da alface, decorrentes de efeito conjugado da lavagem e desinfecção, recomendando ainda que para maior garantia do produto, a aquisição de hortaliças seja feita sob rígidas especificações quanto ao aspecto higiênico-sanitário.

Como garantia do produto pode-se sugerir o uso do sistema APPCC, compreendendo produção, distribuição e consumo de alimentos, sendo a sanificação um ponto de controle efetivo para redução/eliminação de patógenos e bactérias em geral.

Pelos dados obtidos na presente pesquisa fica a recomendação de que os órgãos de controle devem realizar fiscalizações com maior frequência e desenvolver programas de treinamento para os proprietários e funcionários de restaurantes para orientação e conscientização quanto à garantia das preparações oferecidas nos locais. Tais atitudes, se não eliminarem, com certeza reduzirão bastante os riscos de doenças alimentares que a população que consome tais produtos estará exposta.

5 CONCLUSÕES

Através dos resultados das análises microbiológicas do vegetal folhoso alface (*Lactuca sativa*) nos 7 estabelecimentos envolvidos no estudo, pode-se notar diferenças que envolvem aspectos estruturais do estabelecimento e de manipulação, com reflexos na qualidade microbiológica do produto.

Comparando os locais percebe-se que os estabelecimentos com maior número de refeições servidas (B e C) apresentaram os maiores índices de contaminação para o produto, considerando coliformes a 45°C.

O local B esteve 100% fora da adequação, servindo o produto sempre contaminado por coliformes a 45°C em níveis superiores aos tolerados pela legislação.

Os locais D e E apresentaram os maiores níveis de contaminação do produto por *Staphylococcus coagulase positiva*.

Pelas altas contagens de aeróbios mesófilos encontradas em muitas das amostras analisadas ($10^6 - 10^7$ UFCg⁻¹), fica evidente que melhores processos de higienização e/ou sanificação devem ser efetuados no produto, bem como mais atenção na temperatura de armazenamento/oferecimento do produto.

Os locais D e E tiveram 80% de adequação em relação aos coliformes a 45°C, conforme a legislação.

Os locais C e E ofereciam o folhoso fora da temperatura de refrigeração, não cumprindo as normas de armazenamento durante a distribuição, conforme a Portaria CVS-6 (SÃO PAULO, 1999), cuja temperatura deve ser de até 10°C para alimentos frios.

O local F atendeu em 80% aos limites para coliformes a 45°C, 60% de adequação aos parâmetros estabelecidos para *Staphylococcus coagulase positiva* e 40% de adequação nos resultados para aeróbios mesófilos, mostrando-se assim como o estabelecimento de melhores condições para o consumo do produto.

O local G, em todas as coletas, apresentou o produto já cortado, indicando maior manipulação. Mesmo assim, apenas 1 coleta (20%) esteve fora dos limites estabelecidos para coliformes a 45°C pela legislação.

Os locais B, D e G, durante as 7 coletas, ofereceram o folhoso cortado (picado), porém houve divergência nos resultados em relação aos coliformes a 45°C. Enquanto o local B teve todos os resultados (100%) fora do padrão exigido pela legislação, os locais D e G tiveram apenas 1 (20%) amostra com resultado fora do padrão exigido.

Todas as 35 amostras de alface dos 7 restaurantes amostrados não apresentaram contaminação por *Salmonella* em 25 g do produto, o que as coloca de acordo com a legislação vigente da ANVISA (BRASIL, 2001) para este parâmetro microbiológico.

Considerando os resultados das análises com o produto após desinfecção no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da ESALQ - USP, pode-se notar a eficiência da mesma e, portanto, a necessidade dos procedimentos de desinfecção para redução das contagens microbiológicas visando um padrão higiênico-sanitário satisfatório, conforme estabelecido pela Portaria CVS-6 (SÃO PAULO, 1999).

Observando os 7 locais do estudo notou-se que a legislação estabelecida pela Portaria CVS-6 (SÃO PAULO, 1999) para os estabelecimentos em questão não é seguida de acordo.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, N.J.de.; MACÊDO, J.A.B.de. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996. 182 p.

ANDRÉ, M.C.P.B.; CAMPOS, M.R.H.; CORREIA, M.H.S.; SERAFINI, A.B. Estudo da temperatura e pH de saladas de vegetais com maionese de restaurantes comerciais *self-service* à quilo, na região central de Goiânia – ferramentas de monitoramento no controle de qualidade. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.61, p.40-41, abr./ maio. 1999. Resumo.

APPCC na qualidade e segurança microbiológica de alimentos: análise de perigos e pontos críticos de controle para garantir a qualidade e a segurança microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela, 1997. 377 p.

ARRUDA, A.G. Higienização e preparo de vegetais/ legumieria/ garde manger. In_____. **Manual de boas práticas na produção e distribuição de alimentos**. São Paulo: Ponto Crítico, 1996. cap.7. 193 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DE REFEIÇÕES COLETIVAS. (ABERC). **Manual de práticas de elaboração e serviço de refeições para coletividades**. 7.ed. São Paulo: Varela, 2001. 216 p.

_____. **História, objetivos e mercado**. Disponível em: <<http://www.aberc.br.org.br/base.asp?id=2>>. Acesso em: 22 nov. 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis**: official method 989. 17 th ed. Arlington, 2000. 1v.

AZERÊDO, G.A.; CONCEIÇÃO, M.L da.; STAMFORD, T.L.M. Qualidade higiênico-sanitária das refeições em um restaurante universitário. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.18, n.125, p. 74-78, out. 2004.

BASCOMB, S.; MANAFI, M. Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultative anaerobic Gram-positive cocci. **Clinical Microbiology**, Viena, v.11. n.2, p.318-340, 1998.

BEUCHAT, L.R.; NAIL, B.V.; ADLER, B.B.; CLAVEIRO, M.R.S. Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes and lettuce. **Journal of Food Protection**, Ames, v.61, n.10, p.1305-1311, 1998.

BOULOS, M.E.M. da S.; BUNHO, R.M. **Guia de leis e normas para profissionais e empresas da área de alimentos**. São Paulo: Varela, 1999. 175 p.

BRACKETT, R.E. Antimicrobial effect of chlorine on *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.50, n.12, p.999-1003, 1987.

BRACKETT, R.E. Shelf stability and safety of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection. **Journal of Food Protection**, Ames, 55, n.10, p.808-814, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA. Resolução nº12, de 02 de janeiro de 2001. **Dispõe sobre regulamento técnico sobre padrões microbiológicos em alimentos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rdc.htm>>. Acesso em: 1 out. 2004.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997. **Dispõe sobre regulamento técnico sobre princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos**. Disponível em: <<http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php>>. Acesso em: 26 jan. 2006.

CARVALHO, C.O.; SERAFIM, A.B. Grupos e microorganismos isolados da orofaringe, nasofaringe e das mãos dos trabalhadores do restaurante da Universidade de Goiás. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.10, n.45, p.19-24, 1996.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Foodborne illness**. Disponível em: <www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodborne_illness_FAQ.pdf>. Acesso em: 28 fev. 2006.

CHERRINGTON, A.C.; HILTON, M.; PEARSON, G.R.; CHOPRA, I. Inhibition of *E.coli* k12 by short-chain organic acids: lack of evidence for induction of the SOS response. **Journal of Applied Bacteriology**, Bristol, v.2, n.70, p.156-160, 1991.

CHITARRA, M.I.F. **Processamento mínimo de frutos e hortaliças**. Lavras: UFVA, Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão, 2000. 119p. (Textos Acadêmicos).

CORRÊA, A. D. **Fibras na prevenção de doenças**. Lavras: FAEPE – Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão, 2002. p.43. (Textos Acadêmicos).

DAMASCENO, K.S.F.da S.C.; ALVES, M.A.; FREIRE, I.M.G.;TÔRRES,G.F.; AMBRÓSIO, C. L. B.; GUERRA, N. B. Condições sanitárias de *self-services* do entorno da UFPE e das saladas cruas por eles servidas. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.102/103, p.74-78, nov./dez. 2002.

EIROA, M.N.U. Investigação de surtos de toxinfecção bacteriana causada por alimentos processados. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.19, n.2, p. 101-112, 1989.

EIROA, M.N.U.; PORTO, E. Influência de diferentes tipos de vinagre e do hipoclorito de sódio na sobrevivência de *Vibro cholerae* de alface (*Lactuca sativa*), artificialmente contaminadas. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.2, p.199-207, 1996.

ENTANI, E. ; ASAI, M.; TSUJIHATAS, S.; TSUKAMOTO, Y.;OHTA, M. Antibacterial action of vinegar against food-borne pathogenic bacteria including *Escherichia coli* 0157:H7. **Journal of Food Protection**, Ames, v.61, n.8, p. 953-959, 1998.

ERICKSON, J.P.; JENKINS, P. Comparative *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* inactivation rates in four commercial mayonnaise products. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.12, p.913-916, 1991.

ERICKSON, J.P.; MCKENNA, D.N.; WOODRUF, M.A.; BLOOM, J. Fate of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and indigenous spoilage microorganisms in home-style salads prepared with commercial real mayonnaise or reduced mayonnaise dressing. **Journal of Food Protection**, Ames, v.61, n.8, p.953-959, 1993.

FAO. **Sistema de qualidade e inocuidade de los alimentos**: manual de capacitación sobre higiene de los alimentos y sobre el sistema de análisis de peligros y de puntos críticos de controle (APPCC). Roma, 2002. 232 p.

_____. **Código internacional de practicas recomendado**: principios generales de higiene de los alimentos. Roma, 2003. 35p. (CAC/RCP1 – 1969, Rev. 4 –2003; p.13).

FRANCO, B.D.G.de M.; HOEFEL, J. L. M. Coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli* em alfaces comercializados em São Paulo. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, São Paulo, v.3, p.35-47, 1983.

FRANCO, B.D.G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003.182 p.

GABRIEL, K.R. The biplot graphic display of matrices with to applications principal component analysis. **Biometrika**, Cambridge, v.58, n.3, p.453-467, 1971.

GARG, N.; CHUREY, J.J.; SPLITTSTOESSER, D.F. Effect of processing conditions on the microflora of fresh vegetables. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.8, p.701-703, 1990.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2003. 655 p.

GLASS, K.A.; DOYLE, M.P. Fate of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in commercial reduced-calorie mayonnaise. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.9, p.691-695, 1991.

GONÇALVES, P.M.R. Toxinfecções alimentares – uma revisão. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.12, n.53, p. 38-43, 1998.

HAYES, P.R. **Microbiologia e higiene de los alimentos**. Zaragoza:Acribia,1993,369 p.

HOBBS, B.C.; ROBERTS, D. Toxinfecções e controle higiênico-sanitário. In:_____. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. São Paulo: Varela, 1993. cap.9, p.145-152.

HURST, W.C. Sanitation of lightly processed fruits and vegetables. **Hort Science**, Atenas, v.30, n.1, p.22-24, 1995.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms in foods 1: their significance and methods of enumeration**. Toronto: University of Toronto Press, 2.ed , 1978. 434 p.

_____. **Ecologia microbiana de los alimentos: productos alimenticios**. Zaragoza: Acribia, 1980.v.2, p.333-989.

_____. **Microbiologia de los alimentos:** características de los patógenos microbianos. Zaragoza: Acribia, 1996. 606p.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos.** Tradução de E. C. Tondo et al. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. *Stapylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES,F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 4 th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap.39, p.387- 400.

LEITÃO, M.F. de F. O controle microbiológico na avaliação da qualidade de alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.15, n.3, p.253-277, 1981.

LEITÃO, M.F.de F.; MONTEIRO, F.E.; DELAZARI. I.; ANGELUCCI, E. Eficiência de desinfetantes na redução da contaminação bacteriana da alface (*Lactuca sativa*). **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.18, n.2, p. 201-226, 1981.

LEITE JUNIOR, A.F.de.; FLORENTINO, E.R.; SÁ, S.N de.; ASSIS, W de. S.; TORRANO, A.D.M. Avaliação da qualidade microbiológica de carne de sol, comercializada à temperatura ambiente ou sob refrigeração, em Campina Grande, Paraíba. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.69, p.87-92, 2000.

LIMA, V.L.A.G.; MELO, E. de A.; SENA, E.N. Condições higiênico-sanitárias de *fast food* e restaurantes da região metropolitana da cidade do Recife-PE. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.12, n.57, p.50-53, 1998.

MADDEN, J.M. Microbial pathogens in fresh produce: the regulatory perspective. **Journal of Food Protection**, Ames, 55, n. 10, p.821-823, 1992.

MARTINS, L.T. *Staphylococcus*. In: TRABUSLSI, L.R; ALTERTHUM, F; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo, 2000. cap.18, p.149-156.

MORTON, R.D. Aerobic plate count . In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap.7, p.63-67.

NASCIMENTO, A.R.; MARQUES, C.M.P. Avaliação Microbiológica de saladas “in natura”, oferecidas em restaurantes *self-service* de São Luiz – MA. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.12, n.57, p.41-44, 1998.

ODUMERU, J.A; MITCHELL, S.L.; ALVES, D.M.; LYNCH, J.A.; YEE, A.J.; WANG,S.L.; STYLIAOIS, S.; FARBER, J.M. Assessment of the microbiological quality of ready-to-use vegetables for the health-care food services. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 60, v.8, p. 954-960, 1997.

PALÚ, A.P.; TIBANA, A.; TEIXEIRA.L. M.; MIGUEL, M.A.L.; PYRRHO, A. dos S.; LOPES, H.R. Avaliação microbiológica de frutas e hortaliças, servidas em restaurantes *self-service* privados da Universidade Federal do Rio de Janeiro. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.100, p.67-74, set. 2002.

PARK, W.P.; LEE, D.S. Effect of chlorine treatment on cut water cress and onion. **Journal of Food Quality**, Masan, v.18, p.415-424, 1995.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R.; **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Mc Graw- Hill. 1997 , v.2, 565 p.

PORTO, E. **Listeria monocytogenes**: ocorrência em hortaliças, resistência aos sanificantes e sobrevivência em alfaces (*Lactuca sativa*) minimamente processada e acondicionada em atmosfera modificada. 2001. 188p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Universidade de Campinas, Campinas, 2001.

SAS INSTITUTE INC. **SAS**: application's guide. Cary, 2002/2003.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. **Centro de Vigilância Sanitária**. Portaria CVS-6, de 10 de março de 1999. Dispõe sobre regulamento técnico sobre os parâmetros e critérios para o controle higiênico-sanitário em estabelecimento de alimentos. Disponível em: <www.cvs.saude.sp.gov/download.asp?tipo+zip&arquivo=99pcvs.zip>. Acesso em: 30 jan. 2006.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 5.ed. São Paulo: Varela, 2002. 479p.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V.C.A; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 2001.317p.

SILVA, W.P da.; GANDRA, E.A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.18, n.122, p.33-35, jul. 2004.

SIQUEIRA, I.M.C.; MOURA, A.F.P.; GIRÃO, F.G.F.; SANTOS, W.L.M. Avaliação microbiológica das saladas cruas e cozidas de alguns restaurantes industriais da grande Belo Horizonte. **Higiene Alimentar**, São Paulo, V.11, n.49, p. 36-39,1997.

SMULDERS, F.J.M.; BARENDSEN, P.; VAN LOGTESTIJN, J.G; MOSSEL. D.A.A.; VAN DER MAREL, G.M. Review: lactic acid: considerations in flavour of its acceptance as a meat decontaminate. **Journal of Food Technology**, Chicago, v.21, n.4, p.419-436, 1986.

STORCK, C.R.; DIAS, M.A.M.F. Monitoramento da temperatura de preparações quentes e frias em restaurantes *self-service*, na zona urbana de Santa Maria. **Nutrição em Pauta**, São Paulo, v.59, p.30-34,mar/abr. 2003.

SWANSON, K.M.J.; PETRAN, R.L.; HANLIN, J.H. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap.6, p.53–67.