

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS**

MARÍLIA GABRIELLA FOREGATTO LOUZANO

**CONDIÇÕES MICROBIOLÓGICAS DE SALADAS *IN NATURA*
COMERCIALIZADAS POR LANCHONETES TIPO *TRAILER* INSTALADAS NA
REGIÃO CENTRAL DE CAMPO MOURÃO (PR)**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**CAMPO MOURÃO
2014**

MARÍLIA GABRIELLA FOREGATTO LOUZANO

**CONDIÇÕES MICROBIOLÓGICAS DE SALADAS *IN NATURA*
COMERCIALIZADAS POR LANCHONETES TIPO *TRAILER* INSTALADAS NA
REGIÃO CENTRAL DE CAMPO MOURÃO (PR)**

Trabalho de conclusão de curso de graduação, apresentado a disciplina de Trabalho de Diplomação, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo.

Orientadora: Prof^a Dra. Lívia Bracht

**CAMPO MOURÃO
2014**

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS CAMPO MOURÃO
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

TERMO DE APROVAÇÃO

Condições microbiológicas de saladas *in natura* comercializadas por lanchonetes tipo trailer instaladas na região central de Campo Mourão (PR)

Marília Gabriella Foregatto Louzano

Este trabalho foi apresentado às 10h20min do dia 08 de Agosto de 2014 como requisito para obtenção do título de graduação do curso superior de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O candidato foi avaliado pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho **APROVADO**.

Membro 1 – Prof^a. Dr^a. Adriana Aparecida Droval
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR-CM)
Departamento Acadêmico de Alimentos

Membro 2 – Prof^a. Msc. Mirian Sousdaleff Laczkowski
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR-CM)
Departamento Acadêmico de Alimentos

Orientadora – Prof^a. Dr^a. Livia Bracht
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR-CM)
Departamento Acadêmico de Alimentos

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente em tantos momentos de angústia.

Este trabalho é dedicado também às pessoas que sempre estiveram ao meu lado pelos caminhos da vida, me acompanhando, apoiando e principalmente acreditando em mim: a minha mãe Esmeralda, ao meu pai Antonio, aos meus irmãos, Rafaella e Gustavo, minhas avós Geny e Rute, minhas dedicadas e amadas tias, Leila, Rose, Arlene e Silvana, aos meus queridos primos, Marina Victória e João Batista, e ao meu namorado Rodrigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a Deus, pois sem ele eu não teria forças para essa longa jornada.

Considerando este trabalho de conclusão de curso como resultado de uma caminhada que não começou na UTFPR, agradecer pode não ser tarefa fácil, nem justa. Para não correr o risco da injustiça, agradeço de antemão a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

E agradeço, particularmente, a algumas pessoas pela contribuição direta na construção deste trabalho:

Agradeço a minha excelente e dedicada professora orientadora Dra. Livia Bracht que teve paciência e que me ajudou extremamente a concluir este trabalho, sem ela eu não chegaria até aqui.

Faltam palavras para agradecer minha amada mãe Esmeralda, que me apoiou neste sonho desde o primeiro momento, que sempre esteve em meu coração e meus pensamentos durante todo esse tempo.

Ao meu pai, que sempre me apoiou e nunca me deixou faltar nada, sempre me aconselhando, não me deixou desistir e ajudou a financiar este sonho.

Agradeço imensamente minha irmã Rafaella, que nunca mediu esforços para me ajudar, sempre lutando ao meu lado, que nunca me deixou faltar nada, disposta e dedicada em todos os momentos.

Ao meu irmão Luiz Gustavo, que esteve sempre disposto a ajudar.

Agradeço a minha tia Leila que abriu as portas da sua casa e do seu coração e me acolheu de um jeito ímpar, pela ajuda financeira e emocional, sempre acreditou em mim, e ao meu lindo primo, João Batista, que dividiu sua mãe e sua casa e me aguentou em muitos momentos de dificuldade e falta de paciência.

A minha tia Rose, que com toda sua sabedoria, me auxiliou em todos os momentos que a procurei, me ajudando financeiramente e emocionalmente, nunca me deixou desanimar, também à minha linda prima e afilhada Marina Victória, que sempre esteve presente com seus sorrisos e carinhos.

A minha vizinha Geny, que nunca se esqueceu do café da tarde de sábado, das palavras nos momentos certos e daquele dinheirinho escondido junto ao pão.

Agradeço infinitamente as minhas tias Arlene, Silvana e minha vó Rute, por me apoiarem e estarem sempre disponíveis a me receber em sua casa.

Não tenho palavras para agradecer meu amado, amigo e namorado Rodrigo, que nesta etapa final foi excepcional em minha vida, sempre me dando colo e apoio, não deixando que eu desista.

Sou grata imensamente as minhas amigas, Carolina, Jaqueline e Tatiane, que sempre me auxiliaram em todas as tarefas, proporcionando momentos de alegria dentro e fora da instituição, nossa amizade é eterna. Agradeço ao meu único e eterno amigo Lincoln, pelas conversas e momentos de descontração ao longo desses anos.

Aos meus colegas de turma que, além de se tornarem amigos me ensinaram a conviver com pessoas diferentes a mim.

As colegas de laboratório, Daniele e Isabela, pela ajuda e pelos momentos de descontração.

A todos os meus professores que são os maiores responsáveis por eu concluir esta etapa da minha vida, compartilhando a cada dia os seus conhecimentos.

Agradeço a todos que me ajudaram na conclusão deste trabalho.

RESUMO

LOUZANO, Marília Gabriella Foregatto. **Condições microbiológicas de saladas *in natura* comercializadas por lanchonetes tipo *trailer* instaladas na região central de Campo Mourão (PR)**. 2014. 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

Este trabalho apresenta uma pesquisa de condições microbiológicas de saladas *in natura*, comercializadas por lanchonetes tipo *trailer*, que se encontram na região central da cidade de Campo Mourão, Paraná. Este trabalho incluiu a pesquisa de Coliformes fecais a 35°C e a 45°C, pesquisa de *Staphylococcus aureus* e coagulase positiva e *Salmonella* spp. Mediu-se também a temperatura dos freezers onde se armazenam as saladas. Utilizaram-se as metodologias indicadas por Junqueira (1995), Silva (1997) e a Instrução Normativa nº 62/2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Traz como resultado que não foi constatada a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva e de *Salmonella* spp. Porém, encontrou-se altas contagens de Coliformes a 45°C. Os resultados indicam que as amostras de alface analisadas não estão dentro do padrão estabelecido na Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da ANVISA, para hortaliças frescas “*in natura*” para consumo direto.

Palavras-chave: Coliformes. *Staphylococcus*. *Salmonella*. Alface.

ABSTRACT

LOUZANO, Marília Gabriella Foregatto. **Microbiological conditions of “in natura” salads, commercialized on the fast foods chains, localized in the downtown Campo Mourão city, Paraná (PR).** 2014. 49 f. Work of Course Conclusion. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

The objective this work was to demonstrate the microbiological conditions of “in natura” salads, commercialized on the fast foods chains, localized in Campo Mourão city, State of Paraná. This work included the faecal coliforms investigation of 35°C and the 45°C, *Staphylococcus aureus* investigation and positive coagulase and *Salmonella* spp. It was also calculated the refrigerators temperature where the salads are stored. The methodologies denoted by Junqueira (1995), Silva (1997) and the Normative Instruction n° 62/2003 of the *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)*. This study shows the results that wasn't evidenced the presence of positive *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase* and *Salmonella* spp. But it was found high counts of Coliforms a 45°C. The results indicate that the lettuce samples analyzed does not meet the standards established in Resolution RDC n° 12 of the January 2, 2001 by ANVISA, for fresh vegetables “in natura” used to direct consumption.

Keywords: Coliforms. *Staphylococcus*. *Salmonella*. Lettuce.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Contagem de Coliformes a 35°C.....	37
TABELA 2	Contagem de Coliformes a 45°C.....	38
TABELA 3	Contagem de colônias típicas de <i>S. aureus</i> em meio Baird-Parker.....	39
TABELA 4	Resultados das provas bioquímicas para <i>S. coagulase</i> positiva.....	40
TABELA 5	Resultados das provas bioquímicas para pesquisa de <i>Salmonella</i>	41
TABELA 6	Teste bioquímico sorológico com amostra de <i>Salmonella</i>	42

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Fluxograma das etapas de higienização dos vegetais.....	17
-----------------	---	----

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A	Principais características das espécies de <i>Salmonella</i> e de alguns sorotipos importantes epidemiologicamente.....	50
----------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

A.w.	Atividade Aquosa
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BG	Ágar Verde Brilhante
BHI	Ágar Brain Heart Infusion ou Infusão de Cérebro E Coração
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CO2	Dióxido de Carbono
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Caldo <i>E. coli</i>
EMB	Ágar Eosina Azul de Metileno
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
GMP	Good Manufactures Pratices
H₂S	Ácido Sulfídrico
HE	Entérico de Hectoen
KOH	Hidróxido de Potássio
LIA	Ágar Lisina descarboxilase ou Ágar Lisina Ferro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NH₃	Amoníaco
pH	Potencial Hidrogeniônico
POP	Procedimento Operacional Padronizado
ppm	Porção por milhão
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SIM	Sulfeto, Indol e Motilidade
TSI	Ágar Tríplice Sugar Iron ou Ágar Tríplice De Ferro
UFC/g	Unidade Formadora de Colônia Por Grama
VBB	Verde Bile Brilhante
VM	Vermelho de Metila
VP	Vorges-Proskauer
VRB	Vermelho Rubro Brilhante
XLD	Xilose Lisina Desoxicolato

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVOS GERAIS	14
3.	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	15
3.1.	CONCEITOS DE HIGIENE	15
3.2.	PRÉ-PREPARO DE VEGETAIS	15
3.3.	LIMPEZA DE UTENSILIOS UTILIZADOS	19
3.4.	PRINCIPAIS FATORES QUE AFETAM A CONSERVAÇÃO DOS VEGETAIS	19
3.5.	MICROBIOLOGIA DOS VEGETAIS	19
3.6.	COLIFORMES	21
3.7.	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	23
3.8.	<i>SALMONELLA</i>	24
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1.	MATÉRIA PRIMA	28
5.	METODOLOGIAS	28
5.1.	COLETA DAS AMOSTRAS	28
5.2.	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	28
5.3.	PREPARO DAS AMOSTRAS E DILUIÇÕES SERIADAS	28
5.4.	ANÁLISE DE COLIFORMES A 35°C E 45°C	29
5.5.	ANÁLISE DE <i>STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA</i>	30
5.5.1.	Teste de catalase	30
5.5.2.	Teste da coagulase	30
5.5.3.	Teste da termonuclease	31
5.6.	PESQUISA DE <i>SALMONELLA</i>	31
5.6.1.	Teste do citrato	32
5.6.2.	Teste de Voges-Proskauer	32
5.6.3.	Vermelho de Metila	33
5.6.4.	Teste do TSI	33
5.6.5.	Teste do LIA	34
5.6.6.	Teste da Urease	34
5.6.7.	Teste do Malonato	35
5.6.8.	Teste da Fenilalanina	35
5.6.9.	Teste SIM – Sulfeto, Indol e Motilidade	35
5.6.10.	Teste Sorológico	36
6.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
6.1.	PESQUISA DE COLIFORMES A 35°C E 45°C	37
6.2.	CONTAGEM DE <i>STHAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA</i>	39
6.3.	PESQUISA DE <i>SALMONELLA</i>	41
7.	CONCLUSÃO	43
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
9.	ANEXO	50

1. INTRODUÇÃO

Campo Mourão é conhecida nacionalmente como a Terra do Carneiro no Buraco. Com cerca de 90 mil habitantes, é a 21ª entre as 50 cidades mais populosas do Paraná. Com uma distância de 450 quilômetros de Curitiba (capital do Paraná), Campo Mourão é a cidade pólo da Microrregião 12, que agrega 25 municípios, somando uma população regional de aproximadamente 357 mil habitantes. Predominantemente agrícola, tem no plantio de soja e milho seus principais produtos. O agronegócio fortalece a economia empregando uma moderna tecnologia a partir de duas cooperativas agrícolas de projeção nacional, e de uma unidade da maior processadora de carnes do mundo (PREFEITURA MUNICIPAL DE CAMPO MOURÃO, 2013). O fluxo de pessoas na cidade, além de seus habitantes habituais é intenso. É grande também a quantidade de alunos, que vêm para Campo Mourão para estudar nos colégios e universidades da cidade.

O ritmo da vida atual faz com que cada vez um maior número de pessoas se alimente fora de casa. Neste contexto, a procura de alimentos rápidos, como sanduíches, é cada vez maior, tendo em vista a praticidade que este tipo de alimentação proporciona. Nos centros das cidades, muitos destes alimentos são comercializados em lanchonetes do tipo *trailer*, que ficam na rua, onde um grande número de pessoas tem acesso. Todavia, estes alimentos são extremamente susceptíveis à contaminação microbiológica, já que um dos meios de disseminação desses microrganismos é a contaminação cruzada, que ocorre quando estes são transferidos de um lugar para outro por utensílios, equipamentos, mãos, panos, etc. (RODRIGUES et al., 2003). Desta maneira, o risco da ocorrência de toxinfecções alimentares aumenta muito com o consumo deste tipo de alimento.

As toxinfecções alimentares são enfermidades causadas pela ingestão de alimentos contaminados por microrganismos e suas substâncias tóxicas e se constituem um importante problema sanitário (DAMASCENO; ALVES; FREIRE, et al. 2002, *apud* CARDOSO, CARVALHO, 2006). Os alimentos são excelentes substratos para o desenvolvimento de microrganismos e comportam-se como autênticos meios de cultura. Esta característica depende, entretanto, da associação de fatores ligados ao próprio alimento, além de fatores ambientais que permitem o desenvolvimento dos microrganismos (JAY, 1992, *apud* CARDOSO, CARVALHO, 2006).

Em relação aos fatores ligados ao próprio alimento, fatores como atividade de água, pH, acidez, temperatura, potencial de oxirredução, composição química do alimento, e composição gasosa do ambiente interferem no crescimento dos microrganismos (FRANCO, 1996, *apud* CARDOSO, CARVALHO, 2006).

As saladas cruas podem ser consideradas como um bom substrato para a proliferação de microrganismos devido ao seu teor de água que favorece o crescimento de leveduras e bactérias; pH ácido, favorecendo o crescimento de bolores e leveduras; a alta manipulação durante o preparo, podendo levar a contaminação por microrganismos indicadores; além de condições inadequadas de temperatura durante o armazenamento (FRANCO; LANDGRAF, 2005)

Por todos estes motivos, o controle microbiológico desta classe de alimentos é essencial para assegurar sua qualidade. Neste trabalho, investigamos a qualidade microbiológica de saladas *in natura* servidas em lanchonetes tipo *trailer* localizadas na cidade de Campo Mourão (PR).

2. OBJETIVOS GERAIS

Analisou-se a qualidade microbiológica de saladas *in natura* comercializadas em lanchonetes tipo *trailer* (“cachorro-quente”) instaladas nas ruas centrais de Campo Mourão - Paraná.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletou-se as amostras de salada *in natura* das lanchonetes tipo trailer;
- Realizou-se análises de temperatura das saladas em seus locais de comercialização;
- Avaliou-se a presença de Coliformes totais, Coliformes a 45° C, *Salmonella* sp e *Staphylococcus* coagulase positiva nestas saladas.

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1. CONCEITOS DE HIGIENE

As Boas Práticas de Fabricação (BPF), conhecidas internacionalmente como *Good Manufactures Pratices* (GMP), são um conjunto de princípios, normas e procedimentos que administram o correto manuseio dos alimentos, compreendendo desde as matérias-primas até o produto final. São regras de procedimentos para alcançar certo padrão de identidade e qualidade de um produto e/ou um serviço na área de alimentos, onde a eficácia e efetividade deve ser avaliada através de inspeção e/ou investigação (SILVA JUNIOR, 1995).

A capacitação dada aos manipuladores é importante para que haja conhecimentos técnico-práticos imprescindíveis ao desenvolvimento de habilidades e atitudes de trabalho específico na área de alimentos. Deve-se planejar a educação no serviço ou treinamento para que seja um processo contínuo (GÓES et al., 2001) e esses devem evidenciar técnicas de preparo, a forma correta de armazenamento dos produtos, a higiene e a segurança alimentar (FARCHE et al., 2007).

O programa de Boas Práticas de Fabricação traz muitos benefícios, tais como: a fabricação de produtos com mais qualidade e elevada segurança, a diminuição de reclamações proveniente dos consumidores, melhora o ambiente de trabalho, sendo estes mais limpos e seguros além de funcionários desempenhando suas funções com maior motivação e produtividade (MELO, 2007).

Devem-se aplicar essas práticas em todos os fatores operacionais, relacionados aos processos de modificação dos alimentos em produtos que serão consumidos (VICENTE, 1995 *apud* MELO, 2007).

Os dois pré-requisitos de maior importância para a segurança dos alimentos em uma indústria alimentícia são a higiene e a sanitização. A ausência de qualidade e alterações microbiológicas dos alimentos atribui-se à falta ou à inadequada higiene e sanitização na cadeia produtiva.

3.2. PRÉ-PREPARO DE VEGETAIS

De acordo com a Resolução RDC nº 216 de setembro de 2004 (ANVISA), estabelece que haja procedimentos de Boas Práticas para todos os serviços de alimentação a fim de assegurar a qualidade higiênico-sanitária do alimento

preparado; incluindo o Manual de Boas Práticas de Fabricação (BPF) como acréscimo da RDC nº 275 de 21 de outubro de 2002 (ANVISA), onde estabelece os Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) para os estabelecimentos. É necessário que o manual inclua, no mínimo, os requisitos sanitários dos edifícios, a manutenção e higienização das instalações, dos equipamentos e dos utensílios, o controle da água de abastecimento, o controle integrado de vetores e pragas urbanas, controle da higiene e saúde dos manipuladores e o controle da qualidade do produto final. Criou-se o BPF para complementar o Procedimento Operacional Padrão, conhecidos também como POP. Nestes devem estar descritos os procedimentos e instruções sequenciais na realização de operações de rotina a fim de garantir apropriadas condições de preparação e distribuição dos alimentos (BRASIL, 2002).

A avaliação das BPF's pode ser realizada a partir de listas de verificação adequadas, propiciando uma análise detalhada das condições dos estabelecimentos (AKUTSU, 2005).

Neste contexto, Arruda (1999) exibiu um fluxograma de higienização dos vegetais (figura 1).

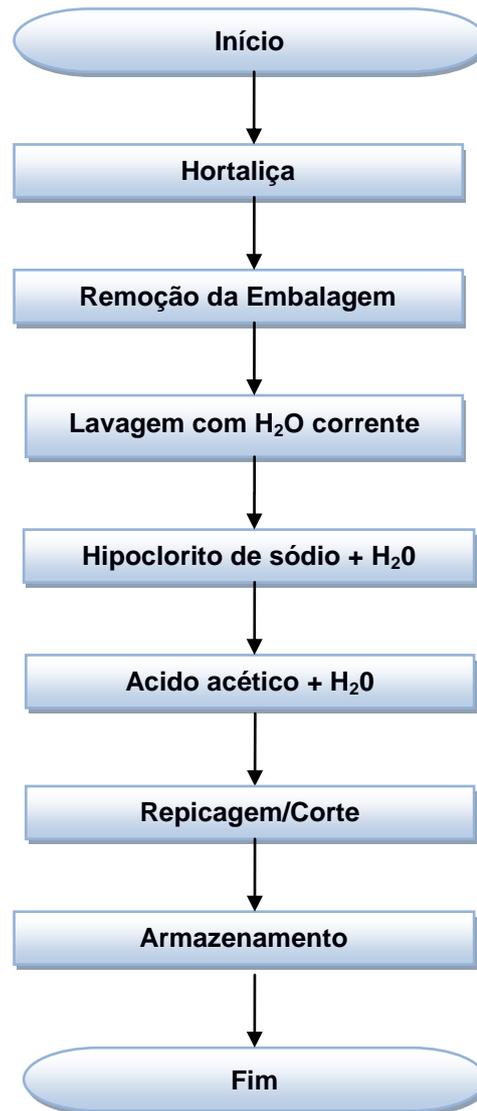


Figura 1 – Fluxograma das etapas de higienização dos vegetais. Fonte: (Arruda, 1999) – modificado.

Moretti (2007), Arruda (1999) e Silva Junior (1995) apresentam algumas etapas que devem ser executadas a fim de higienizar os vegetais:

- Na recepção ou após serem compradas, retiram-se as embalagens e inspecionam-se as hortaliças e avalia-se sua qualidade. Descartam-se as que apresentam podridões, machucados ou quaisquer outros danos.

- A pré-lavagem tem por objetivo remover as sujeiras maiores, como areia, barro, terra, folhas, etc.. Pode-se realizar essa pré-lavagem com água corrente ou não, mas sempre água limpa e, de preferência, potável.

- Em seguida, coloca-se de molho com solução de hipoclorito de sódio que se prepara da seguinte forma: 1mL de hipoclorito de sódio a 10% para 10L de água, ou 5mL (1 colher de sopa) de água sanitária com 2,5% (encontra-se essa concentração

indicada no rótulo da água sanitária) de cloro livre para 10L de água. Todos os recipientes usados também devem ser higienizados, podendo ser de plástico ou de aço inoxidável. Devem-se manter as hortaliças totalmente imersas na água por aproximadamente 15 minutos e, quando houver muita terra aderida, as hortaliças devem permanecer na água por mais tempo do que o habitual, para que a terra amoleça e seja facilmente removida. Troca-se a água a cada nova carga de hortaliças. Após este processo, devem-se lavá-las para retirada do hipoclorito de sódio.

- Sendo a última etapa do processo de higienização dos vegetais, mas a não menos importante, o CODEX ALIMENTARIUS, FAO/WHO (1972) *apud* Silva Junior (1995) é incisivo quando diz que, “tudo que sofrer atuação de produtos químicos com ação desinfetante, deve ser enxaguado com água potável”. Entende-se com isso que é imprescindível o enxágue com água, corrente ou não, para eliminar resíduos de cloro e seus estabilizantes e outros resíduos orgânicos. Pode-se utilizar também uma solução de vinagre a 2% na água de enxágue conforme trabalho de Mauro Leitão (1981) *apud* Silva Junior (1995), a qual melhora a eliminação de resíduos através da quebra da ação tensoativa das moléculas entre resíduos, microrganismos e a superfície dos vegetais.

Baruffaldi et al. (1984), compreenderam que o tratamento químico, com solução de hipoclorito de sódio de 40 ppm de cloro livre, em folhas de alface por um período de exposição de 10 minutos apontou-se eficaz do ponto de vista parasitológico. Fontana (2006), instrui que 15 minutos em soluções de hipoclorito de 50 a 200 ppm são suficientes para conquista dos efeitos sanitizantes para coliformes. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2007) recomenda, em cartilhas para manipuladores de alimentos, que, posteriormente a lavagem em água corrente, as folhas de alfaces permaneçam imersas em solução de água clorada a 200 ppm (uma colher de sopa para um litro de água) por 10 minutos para que possam ser consumidas com segurança. Ainda, deve-se realizar o corte com materiais limpos e desinfetados, e então realizar o armazenamento que deve ser feito em ambiente refrigerado, com temperatura entre 3°C e 5°C, com umidade em torno de 90%.

De acordo com Arruda (1999), 48 horas é prazo máximo de validade das saladas cruas, desde que armazenado a temperatura de no máximo 8°C. Quando se mantêm os alimentos em temperaturas superiores a 10°C, estes podem ficar

expostos por até quatro horas, ou por até duas horas em temperaturas entre 10°C e 21°C.

3.3. LIMPEZA DE UTENSÍLIOS UTILIZADOS

Para que haja eficiência no programa de higiene e funcione de maneira regular, seja em uma indústria, restaurante ou em casa, é imprescindível que os métodos admitidos para a higienização levem em consideração todo o conjunto, tais como as instalações, os utensílios, os equipamentos e os manipuladores (EVANGELISTA, 2002).

As superfícies que entram em contato com as frutas e hortaliças devem ser corretamente higienizadas, de forma a não incorporar contaminações de origem física, química ou microbiológica. A higienização adequada inclui as etapas de pré-lavagem, uso de detergentes, enxágue e sanitização. Deve-se fazer uso de água de boa qualidade, dentro dos padrões legais vigentes, e detergentes neutros, principalmente à base de agentes tensoativos (MORETTI, 2007).

3.4. PRINCIPAIS FATORES QUE AFETAM A CONSERVAÇÃO DOS VEGETAIS.

Por possuir um alto teor de atividade de água e substâncias nutritiva como ácidos, açúcares, amidos, proteínas e vitaminas, os vegetais frescos deterioram-se mais facilmente. Estas substâncias estão presentes nas células vivas dos vegetais em desenvolvimento, e as suas inter-relações são controladas por uma variedade de enzimas. Quando se remove o vegetal da planta, o equilíbrio entre múltiplos nutrientes não é mais controlado. Então, iniciam-se as reações de hidrólise e oxidação. A consequência dessas reações puramente químicas, motivadas pelas enzimas, são acidificação e escurecimento. Estes processos são acelerados pelo extravasamento dos líquidos intercelulares e pelo corte ou ferimento do vegetal. Em virtude do alto teor de água e presença de substâncias nutritivas, a acidificação e decomposição microbiana também ocorrem. Além destas alterações, ocorre também a desidratação pela exposição ao meio e, conseqüente murchamento dos vegetais ou hortaliças (RIEDEL, 1992).

3.5. MICROBIOLOGIA DOS VEGETAIS

Os vegetais dispõem de alto teor de umidade, ou seja, são altamente perecíveis, e o grau de acessibilidade de água em um alimento, que é definido como a atividade de água, tem sido considerada uma propriedade fundamental no controle da qualidade de alimentos em razão das reações deteriorativas e o desenvolvimento de microrganismos (EMBRAPA, 2003).

Alimentos abundantes em água, com valores de atividade de água acima de 0,9 sofrem facilmente contaminação microbiológica, à medida que as reações químicas acontecem em atividade entre 0,4 a 0,8 (BOBBIO & BOBBIO, 2001).

Relaciona-se a qualidade microbiológica de alimentos *in natura* à existência de microrganismos deterioradores que contribuirão com as alterações das características sensoriais do produto, tais como cor, odor, textura e aparência, durante o tempo de vida útil. Classificam-se os vegetais como alimentos altamente perecíveis devido à alta atividade de água e condições ideais para o crescimento de microrganismos patogênicos. Entre os patógenos de origem alimentar, bactérias como *Escherichia coli*, *Listeriamonocytogenes*, *Salmonella* e *Shiguella*, relacionam-se com surtos de origem alimentar (BEUCHAT, 2002).

A utilização de água contaminada com patógenos para efetuar a irrigação das hortaliças tem sido objeto de numerosos estudos, devido que integra uma das principais vias de contaminação dos produtos vegetais. Os microrganismos patogênicos são capazes de migrar a partir do solo contaminado e da água aplicada no solo para o interior da planta, protegendo-se então dos processos utilizados na desinfecção. Diversos estudiosos têm demonstrado experimentalmente a contaminação de alface e de tomate no campo de cultivo com *E. coli* e *Salmonella*, através de irrigação em spray ou superficial, ambos com água contaminada (SANTOS; PEDROSO, 2009).

Por outro lado, o verão gradativamente seco das últimas décadas tem instigado ao uso crescente de águas residuais, provenientes do tratamento de efluentes nas explorações agrícolas, para regar culturas de vegetais. Visto que *E. coli* e *Salmonella* spp. sobrevivem em harmonia nos sedimentos, a inundação sazonal dos campos em épocas chuvosas contribui também para alavancar a contaminação. A utilização de esgotos humanos sem tratamento pode igualmente constituir fonte de muitos patogênicos (SANTOS; PEDROSO, 2009).

De acordo com MICHE (2005) no Brasil, constantemente as verduras são adubadas com dejetos humanos ou irrigadas com águas contaminadas com matéria

fecal. Agrega-se a este fato o hábito alimentar de consumir hortaliças *in natura*, possibilitando a exposição de uma grande parte da população às formas de transmissão de inúmeros parasitas. As parasitoses são facilmente disseminadas por vegetais frescos sendo contaminados antes da colheita devido à água de irrigação. Esses parasitas são resistentes aos tratamentos de desinfecção aplicados ao processamento mínimo e devem ser considerados como fonte de contaminação real. A averiguação da presença de helmintos em hortaliças, desta forma, reveste-se de grande interesse para a saúde pública, visto que concede dados para a vigilância sanitária a respeito do estado higiênico desses produtos e permite o controle retrospectivo das condições em que foram cultivados.

De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2007), um dos principais locais de ocorrência de surtos de DTA no Brasil são os restaurantes, ficando atrás somente das residências. Visto que estão relacionados com as falhas mais frequentes nos serviços de alimentação, tais como: o preparo do alimento muito tempo antes do consumo, ocasionando condições de tempo e temperaturas apropriadas para o desenvolvimento de microrganismos; a cocção imprópria e insuficiente para inativar os microrganismos patogênicos; a presença de manipuladores de alimentos infectados ou colonizados por microrganismos patogênicos; a superfícies de equipamentos, utensílios e objetos contaminados, sendo fontes de contaminação cruzada (MARMENTINI; RONQUI; ALVARENGA, 2011).

O isolamento e identificação de todos os microrganismos patogênicos em alimentos requerem técnicas muitas vezes complicadas e onerosas e a obtenção dos resultados é demorada. Por isso, na averiguação das condições sanitárias dos alimentos, são pesquisados certos grupos de bactérias denominados indicadores de poluição fecal. A presença destes microrganismos, que são habitantes normais do intestino de animais e humanos, designa a presença de contaminação de origem fecal e a possibilidade da existência de microrganismos patogênicos de origem intestinal. As principais bactérias usadas como indicadores de poluição fecal são os grupos dos coliformes (CHAGAS, et al., 1981).

3.6. COLIFORMES

As condições higiênicas são avaliadas através do índice de coliformes totais, já os coliformes fecais são empregados como indicadores de contaminação fecal, avaliando também as condições higiênico-sanitárias ineficientes, considerando acreditar que a população deste grupo é constituída de uma ampla proporção de *E. coli* (SIQUEIRA, 1995).

Incluem-se no grupo dos coliformes totais todas as bactérias na forma de bastonetes gram-negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos. Usa-se esta definição também para o grupo de coliformes fecais, entretanto, limitando-se aos membros com a capacidade de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 horas entre 44,5 - 45,5°C (HITCHINS et al., 1996 *apud* Cardoso et al., 2001).

O habitat das bactérias que pertencem ao grupo coliforme é o trato intestinal do homem e também de outros animais. Ainda assim, alguns sorotipos são patogênicos para o homem e outros animais e então não são considerados como fazendo parte da flora intestinal normal (PARDI et al., 1995).

As infecções causadas por *E. coli* são difundidas principalmente por três vias, tais como o contato direto com animais, o contato com humanos e a ingestão de alimentos contaminados (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997).

Descobriu-se a *Escherichia coli* em meados de 1885 pelo Dr. Theodor Escherichia, e definiu-se como uma espécie bacteriana em forma um bastonete Gram-negativo, não esporulado, oxidase negativa, anaeróbia facultativa com a capacidade de fermentar a glicose e a lactose produzindo ácidos e gases, reduzem nitrato a nitrito. Metaboliza uma ampla variedade de substâncias como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídeos e ácidos orgânicos, movimentam-se por flagelos peritríquios ou ainda, é imóvel, utiliza fontes de carbono como acetato e glicose para seu crescimento e pertencem à família *Enterobacteriaceae* (JAY, 2005; EVANGELISTA, 2002).

Considera-se a *E. coli* a mais importante indicador de contaminação fecal, embora possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais (SILVA & JUNQUEIRA, 1995).

Sua presença em alimentos crus é considerada um indicador de contaminação fecal, direta ou indireta. A contaminação fecal direta acontece durante o processamento de matérias-primas e devido à ausência de higiene pessoal dos manipuladores. Já a contaminação indireta pode ocorrer através de águas poluídas

e de esgoto. Torna-se uma grande preocupação a sua presença em alimentos processados pelo calor (RAY, 1996 *apud* SILVA, 2002).

As diferentes classes de *Escherichia coli* expressam características e síndromes específicas, onde são reconhecidas internacionalmente ao longo do tempo. As cepas de *E. coli* enteropatogênica são agentes causadores da diarreia infantil e recém-nascidos entretanto, muitos adultos são considerados portadores, mas não apresentam sintomas da doença, levando a acreditar que a imunidade adquirida ocorra com o passar do tempo (ROBINS BROWNE et al., 1987 *apud* FRANCO, 2002).

As cepas de *Escherichia coli* produtoras de enterotoxinas são conhecidas como ETEC e um número limitado de sorotipos de *Escherichia coli* está associado com regularidade aos casos de diarreia. Os sintomas se caracterizam por diarreia aquosa, acompanhada de febre baixa, dores abdominais e náuseas. Em indivíduos desnutridos, a gastroenterite pode durar várias semanas, levando a um quadro de desidratação grave (PADHYE & DOYLE et al., 1995 *apud* FRANCO, 2002).

3.7. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

O gênero *Staphylococcus aureus* não participa dos padrões microbiológicos para alimentos do grupo das hortaliças, legumes e similares, contudo, sua presença é causadora de doenças de origem alimentar, havendo abuso de tempo e temperatura. A *S. aureus* é considerada a única espécie patogênica do grupo dos *Staphylococcus* (HATAKKA et al., 2000 *apud* SILVA, 2013).

As bactérias deste gênero são cocos Gram-positivos, com tendência de formar agrupamentos em formato semelhante a cachos de uva, pertencentes à família *Staphylococcaceae*, são aeróbias e também anaeróbias facultativas, imóveis, microrganismos mesófilos que se desenvolvem entre 7°C e 47,8°C, produzindo enterotoxinas entre 10°C a 46°C (TRABULSI, 2001).

O gênero *Staphylococcus* possui 33 espécies, sendo que 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. Normalmente, esse gênero integra a microbiota da pele humana normal e de outros locais anatômicos. A espécie de maior interesse médico, principalmente em ambiente nosocomial, é o *S. aureus*, que está frequentemente relacionado com diversas infecções em seres humanos (KONEMAN, 2001).

Encontra-se o *S. aureus* na água, no ar, no solo, no homem e nos animais. No homem o seu principal reservatório, são as fossas nasais, de onde se propagam direta ou indiretamente para a pele e feridas. A umidade de crescimento desse patógeno é bastante variável, ou seja, na mais ampla faixa de atividade de água (0,83 a 0,99), em condições aeróbias, sendo possível também a produção de enterotoxina nesta faixa de atividade de água. As bactérias deste gênero são tolerantes a concentrações de 10% a 20% de cloreto de sódio e nitratos, o que torna os alimentos curados veículos potenciais para se desenvolverem. O período de incubação de um surto varia de trinta minutos a oitos horas, sendo a média de duas a quatro horas, após a ingestão do alimento contaminado (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

O *S. aureus* tem potencial para causar intoxicação no consumidor mediante ingestão de alimentos que apresentem a enterotoxina estafilocócica pré-formada, dessa forma, o agente causador dos sintomas, não é a bactéria, mas sim suas toxinas. As cepas de *S. aureus* enterotoxigênicas encontram-se nos alimentos a partir de sua obtenção primária ou chegar posteriormente durante o processamento, a partir dos manipuladores. Os sintomas usualmente rápidos incluem náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia, suores, dor de cabeça, desânimo e por vezes diminuição da temperatura corporal (VIEGAS, 2009).

A ocorrência de *Staphylococcus aureus* em alimentos pode ocorrer em consequência de contaminação na superfície de equipamentos e utensílios mal sanitizados em companhia da manipulação inadequada. Os indivíduos que possuem esta bactéria devem evitar o contato com alimentos, pois são grandes fontes de contaminação quando tosse ou respiram sobre os alimentos, ou ainda, trabalham com cortes e arranhões na pele, operando como um veículo de contaminação do alimento (FRAZIER; WESTHOFF, 1993).

A pesquisa de *S. aureus* pode ser realizada com dois objetivos, tanto para confirmar o envolvimento em surtos de intoxicação alimentar, quanto para controlar a qualidade higiênico-sanitária dos processos de produção de alimentos, já que essa bactéria age como indicador de contaminação pós-processo, manipulação ou das condições de sanificação das superfícies destinadas ao contato com alimentos (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001).

3.8. SALMONELLA

O gênero *Salmonella* deve o seu nome a Daniel Elmer Salmon, bacteriologista veterinário que junto com Theobald Smith, isolaram e descreveram, pela primeira vez, o que chamavam de bacilo da peste suína, em 1885 (GOMES, 2009), porém os surtos de salmoneloses humana foram relatados pela primeira vez por Gaffky em 1880.

Caracterizam-se os membros do gênero *Salmonella* spp. por sua morfologia tipo bastonete, onde mede aproximadamente 0,7 - 1,5 µm. Esse grupo de bactéria reage negativamente ao teste de Gram. Frequentemente mostram motilidade através de flagelos peritríquios. São anaeróbios facultativos. A glicose e alguns carboidratos são consumidos, produzindo ácido e usualmente gás (LE MINOR, 1984; HOLT et al., 1994; JAY, 1994b apud FRANCO, 2002).

Sua temperatura ótima de crescimento é de aproximadamente 38°C e a temperatura mínima, cerca de 5°C, não formadoras de esporos, são relativamente termossensíveis, podendo ser destruídas a 60°C, em um tempo de 15 a 20 minutos. A atividade de água (A_w) afeta diretamente o desenvolvimento da bactéria embora o limite mínimo seja de 0,94, as salmonelas podem sobreviver por até mais de um ano em alimentos com baixa A_w (GERMANO 2008).

Há duas espécies de *Salmonella*, *S. entérica* e *S. bongori*, e estas são divididas em grupos. A *Salmonella* entérica divide-se em seis subespécies tais como a entérica, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. A segunda é a *bongori* (formalmente chamada de *Salmonella* entérica subespécie *bongori*), sendo que a *Salmonella* subespécie entérica apresenta 1.435 sorovares dos 2.435 conhecidos. Os sorovares da subespécie entérica representam mais de 99,5% das cepas isoladas (HOLT, 1992 apud FRANCO, 2002).

O trato intestinal é o principal *habitat* das espécies de *Salmonella* spp. de animais como aves, répteis, animais de granja, pessoas e, acidentalmente, insetos. Mesmo que o seu *habitat* principal seja o trato intestinal, algumas vezes podem ser situadas em outras partes do organismo. No *habitat* intestinal, as células podem ser excretadas nas fezes e destas, serem transportadas através de insetos e outros seres vivos a um grande número de lugares, também sendo encontradas na água, em especial, contaminada. Quando a água e os alimentos contaminados por insetos ou por outras formas de contaminação são consumidos por pessoas e animais, estas bactérias são propagadas novamente por meio de matéria fecal, completando-se desta forma um ciclo na natureza (LE MINOR, 1984 apud FRANCO, 2002).

A presença de *Salmonella* spp. em alimentos é um relevante problema de saúde pública, não podendo ser tolerado, pois os sinais e sintomas podem ser mal diagnosticados, sobrecarregando ainda mais todo o sistema de saúde. Deve-se destacar que a maioria dos sorotipos desse gênero são patogênicos ao homem, expondo diferenças de sintomatologia em decorrência da variação no mecanismo de patogenicidade, além da idade e da resposta imune do hospedeiro (TRABULSI, 2001).

A salmonelose é uma das principais zoonoses para a saúde pública em todo o mundo, manifestando-se pelas suas características de endemicidade, alta morbidade e, sobretudo, pela dificuldade da adoção de medida no seu controle (LOURENÇO; REIS; VALLS, 2004).

Ocorreram mudanças no perfil epidemiológico de enfermidades transmitidas por alimentos em razão à expansão dos mercados de consumo, a globalização econômica, mudanças dos hábitos alimentares e crescimento no consumo de alimentos industrializados ou produzidos fora do lar. No Brasil, as doenças infecciosas, parasitárias e do aparelho digestivo corresponderam a 9,2% do total de casos de mortalidade, sendo as regiões do Norte e Nordeste as mais afetadas (FUNASA, 2004).

As infecções entéricas em decorrência de outras *Salmonellas*, ou também chamadas de salmoneloses, desenvolvem um quadro de infecção gastrointestinal, havendo como sintomas, dores abdominais, diarreia, febre baixa e vômito, sendo raros os casos clínicos fatais. Os sintomas duram cerca de 72 horas e os alimentos mais incriminados são carne bovina, aves, suíno e ovos crus (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

A eficácia de alguns microrganismos sobreviverem em certos alimentos depende não somente de suas características físicas e nutricionais, mas também de fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos, tais como temperatura, pH, atividade de água entre outros, como também, manipulação e armazenamento inadequado. Responsabilizam-se pela ocorrência de surtos de salmoneloses alimentos com alto teor de umidade e alta porcentagem de proteína, como produtos lácteos, ovos, carnes e seus derivados. Produtos de origem vegetal como verduras e frutas, podem ser contaminados durante diferentes etapas de cultivo, devido a práticas agrícolas incorretas, sobretudo à adubação com excrementos não tratados e águas contaminadas (GERMANO, 2003).

Segundo Hobbs e Hoberts (1998), se a contaminação ocorre no local de preparo dos alimentos, é indispensável que seja realizado de maneira correta a higienização dos equipamentos, utensílios e superfícies. Destacam-se, entre as medidas de controle e prevenção, evitar riscos de contaminação cruzada, assegurar um aquecimento suficiente dos alimentos, seguidos de uma refrigeração rápida quando armazenados e impedir de deixá-los muito tempo à temperatura ambiente. Deve-se também, comprovar que os manipuladores de alimentos não são portadores de *Salmonella*, controlar os roedores, pássaros e insetos nas fábricas e terrenos adjacentes e ainda, incrementar a vigilância e detecção de *Salmonella* sobre todos os alimentos cozidos (FRANCO, LANGRAF, 2008).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATÉRIA PRIMA

Para a realização deste trabalho, utilizaram-se amostras de alface *in natura* que são servidas em lanches, comercializados em 2 lanchonetes tipo *trailer*, designados como Local A e Local B, na região central de Campo Mourão – Paraná.

As amostras foram recolhidas no dia 12 de abril de 2014, aproximadamente às 19 horas e transportadas para o laboratório microbiológico da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, onde se realizaram as análises imediatamente. A temperatura do freezer foi medida com o auxílio de um termômetro.

5. METODOLOGIAS

5.1. COLETA DAS AMOSTRAS

Um saco estéril com aproximadamente 70g de amostra de alface foi recolhido de cada *trailer*, totalizando duas amostras. Estas foram acondicionadas em caixas de isopor com gelo e encaminhadas para o laboratório da UTFPR para a realização das análises.

5.2. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As metodologias utilizadas seguiram as indicações de Junqueira (1995), Silva (1997) e a Instrução Normativa nº 62/2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2003).

5.3. PREPARO DAS AMOSTRAS E DILUIÇÕES SERIADAS

Pesou-se 25g de amostra em saco plástico estéril, e adicionou-se 225mL de solução salina peptonada 0,1%, sendo homogeneizados em stomacher por 60 segundos, constituindo a diluição 10^{-1} .

Para preparar a diluição 10^{-2} , retirou-se uma alíquota de 1mL da diluição 10^{-1} adicionando-a a um tubo de ensaio com 9mL de solução salina peptonada 0,1%, seguindo-se de homogeneização.

As diluições restantes foram feitas da mesma maneira, a partir da diluição imediatamente anterior, até a diluição 10^{-4} .

5.4. ANÁLISE DE COLIFORMES A 35°C E 45°C

Inoculou-se alíquotas de 1mL de cada diluição das amostras homogeneizadas, em profundidade no ágar vermelho rubro brilhante (VRB), em duplicata. Na composição do VRB há cristal violeta que é um inibidor das bactérias gram-positivas, e uma mistura de sais biliares, que beneficia o crescimento dos coliformes, em desfavor das demais. As placas foram incubadas por 24 horas, à temperatura de 35°C. Após este período, realizou-se a contagem das colônias típicas (róseas, com 0,5 a 2mm de diâmetro rodeadas ou não por uma zona de precipitação da bile presente no meio) e atípicas.

Foram, então selecionadas 6 colônias típicas e atípicas de cada placa de Petri que apresentou entre 15 a 150 colônias, para cada amostra. Estas colônias foram repicadas em caldo verde bile brilhante (VBB), incubando-as por 48 horas a 35°C, e em caldo E.coli (EC), que se incubou por 48 horas a 45°C sob agitação constante. Adicionaram-se dentro dos tubos com caldo, tubos de Durhan invertidos. Os tubos com formação de gás dentro destes tubos de Durhan caracterizam crescimento positivo. Em ambos os caldos existe a mistura de sais biliares e lactose como carboidrato, permitindo a distinção daquelas bactérias que fermentam este açúcar com produção de gás.

Os resultados para coliformes a 35°C e a 45°C foram expressos em UFC/g, levando em conta as contagens iniciais nas placas de VRB, conforme a equação 1.

$$R = \frac{C \times c \times d}{r} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde,

R: resultado;

C: número de colônias contadas;

c: número de colônias confirmadas;

r: número de colônias repicadas e

d: diluição utilizada.

Então, para o resultado final, aplicou-se a equação 2:

$$RF = Rt + Ra \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

RF: resultado final;

Ra: colônias atípicas e

Rt: colônias típicas.

Obteve-se o resultado de colônias típicas e atípicas (Rt e Ra), fazendo então, uma médias das colônias repicadas, respectivamente.

5.5. ANÁLISE DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE POSITIVA

De cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) foram retirados 0,1mL e inoculados na superfície do ágar Baird Parker, espalhando-o com a alça de Drigalski, e incubou-se por 48 horas a 35°C.

O ágar Baird Parker adicionado com solução de gema de ovo possibilita a verificação das atividades proteolítica e lipolítica do *Staphylococcus aureus*, por meio do surgimento de um halo de transparência e um de precipitação em volta da colônia, respectivamente. Além disso, o *Staphylococcus aureus* reduz anaeróbia e aerobiamente o telurito de potássio, causando colônias negras.

Após a incubação, realizou-se a contagem do número de colônias que apresentaram características típicas. Estes números de colônias contadas foram multiplicadas pelo fator 10 e, em seguida, pela recíproca da diluição correspondente a placa de contagem, adquirindo-se assim o valor da contagem presuntiva de *Staphylococcus* sp., por grama de amostra. Inoculou-se em caldo BHI cinco colônias suspeitas por amostra, distribuído em tubos de ensaio. Incubou-se todos os tubos por 24 horas a 35°C.

Submeteram-se as culturas em caldo BHI às provas bioquímicas de catalase, coagulase e termonuclease.

5.5.1. Teste de catalase

Em uma lâmina de vidro, adicionou-se uma gota de caldo BHI com cultura, adicionando-se juntamente uma gota de peróxido de hidrogênio 3% e verificou-se a produção de bolhas, característica da ação da catalase sobre o reagente.

5.5.2. Teste da coagulase

Em um tubo de ensaio estéril, misturou-se 0,5mL de caldo BHI com cultura e 0,5mL de solução de plasma de coelho reidratado, e incubou-se por 4 horas em estufa bacteriológica, a 35°C, observando se houve a formação de coágulos.

5.5.3. Teste da termonuclease

As culturas em caldo BHI foram fervidas em banho-maria por 15 minutos, inoculou-se nos orifícios do ágar DNase Azul de Toluidina, procedendo a incubação por até 4 horas, em câmara úmida.

Observou-se se houve o aparecimento de um halo de clarificação ao redor dos orifícios, com diâmetro superior a 1mm, que é indicativo de reação positiva para termonuclease.

5.6. PESQUISA DE *SALMONELLA*

Para realizar o preparo da amostra para esta análise, utilizou 225mL de água salina peptonada 1% tamponada e 25g de amostra, sendo homogeneizada em stomacher por 3 minutos. Levou-se esta mistura à estufa bacteriológica por 24 horas a 35°C, realizando a etapa de enriquecimento não seletivo.

A próxima etapa foi a de enriquecimento seletivo, onde inoculou-se 1mL da amostra em 10mL de caldo selenito-cistina, e 0,1mL em caldo Rappaport Vasilliadis, levando-se em banho-maria com agitação por 24 horas a 41°C. No caldo Rappaport Vasilliadis, o verde malaquita e o cloreto de magnésio atuam como agente seletivo da microbiota acompanhante, enquanto a presença de peptona de farinha de soja estimula o crescimento de *Salmonella*. No caldo selenito-cistina, o agente inibidor selenito de sódio age inibindo os coliformes e *enterococcus*.

De cada tudo de caldo selenito-cistina e Rappaport Vasilliadis foram feitas estrias descontínuas em placas de petri com ágar verde brilhante ou brightgreen (BG), xilose lisina desoxicolato (XLD) e entérico de Hectoen (HE), onde foram incubadas por 24 horas a 35°C.

O ágar BG apresenta em seus componentes bile bovina e um corante derivado do trifenilmetano (verde brilhante), responsáveis pela inibição de microrganismos Gram-positivos, e as colônias características incolores ou de cor rosada entre translúcidas a ligeiramente opacas. Quando ao redor microrganismos fermentadores de lactose, podem apresentar-se de cor verde-amarelada.

Colônias transparentes, cor de rosa escuro, com ou sem centro preto são características do ágar XLD. Cepas fortemente produtoras de H₂S podem formar colônias com centro preto brilhante e grande, ou então totalmente preto. Colônias que fermentam sacarose ou lactose produzem colônias amarelas com ou sem centro preto. Várias cepas de *Salmonella* podem apresentar colônias transparentes amarelas, atípicas com ou sem centro preto.

No ágar HE as colônias de *Salmonella* são verde-azuladas, com ou sem centro preto, onde cepas fortemente produtoras de H₂S podem produzir colônias totalmente pretas, colônias fermentadoras de lactose ou sacarose são normalmente de cor rosácea.

Identificaram-se as colônias características de cada placa e repicou-se três colônias por amostra em ágar nutriente inclinado e manteve-se em estufa bacteriológica por 24 horas a 35°C.

Submeteu-se aos seguintes testes bioquímicos: Citrato, Vermelho de Metila e Voges-Proskauer (VM-VP), Ágar Tríplice Sugar and Iron (TSI), LIA, Urease, Malonato, Fenilalanina e Sulfeto, Indol e Motilidade (SIM) as culturas que foram incubadas em ágar nutriente inclinado.

Após inoculação das culturas nos meios supramencionados e incubação por 48 horas a 35°C e 96 horas para a prova de Vermelho de Metila, adquiriu-se a confirmação se a amostra estava ou não contaminada por *Salmonella*. Para uma melhor averiguação, o teste sorológico também foi realizado.

5.6.1. Teste do citrato

Observou-se se o microrganismo tem habilidade de utilizar o citrato como fonte de carbono, repicando a colônia em ágar citrato de Simmons. Quando isto ocorre, a bactéria também faz uso dos sais orgânicos de amônia como única fonte de nitrogênio, formando amônia, que enobrece o pH do meio causando a viragem do indicador ácido-base azul de bromotimol ou crescimento no local do inóculo, que de verde passa há azul.

Realizou-se a inoculação no ágar citrato de Simmons com estrias e picada na rampa, incubando por até 4 dias, a temperatura de 35°C.

5.6.2. Teste de Voges-Proskauer

A reação de Voges-Proskauer (VP) avalia a formação do acetilmetilcarbinol, conhecido também como acetoína, a partir da glicose. Em presença de oxigênio atmosférico e hidróxido de potássio a 40%, a acetoína é convertida à diacetil e o α -naftol age como catalisador produzindo um complexo de cor vermelha (forma-se um anel avermelhado na superfície do caldo). O α -naftol acelera a reação e intensifica a cor.

Um tubo com caldo VM-VP foi inoculado com cultura em ágar nutriente, e incubou-se por 48 horas a 35°C. Retirou-se uma alíquota de 2,5mL e transferiu-se para um tubo de ensaio estéril para o teste de vermelho de metila, sendo novamente incubado. No caldo restante no tubo foi adicionado o reagente de Barrit (α -naftol 5% em solução alcoólica e hidróxido de sódio 40%) e observou-se a coloração do meio por até 30 minutos.

5.6.3. Vermelho de Metila

Utilizar glicose para abastecer suas necessidades nutricionais é característico de inúmeras bactérias. Entretanto, os produtos finais que resultam da oxidação da glicose variam dependendo das vias metabólicas que há em cada microrganismo. Ao fermentarem a glicose, algumas bactérias produzem ácidos orgânicos (lático, succínico, fórmico, acético e etc.) que reduzem o pH do meio. Essas desigualdades metabólicas se evidenciam, então, pela adição de uma solução de vermelho de metila (indicador de pH) ao meio onde foi cultivado o microrganismo de interesse. Em meios ácidos, com o pH abaixo de 4, o indicador torna-se vermelho. Em meios com o pH maior ou igual a 6, o indicador obtém cor amarela.

A inoculação fez-se em caldo VM-VP, conforme supracitado, procedendo-se a incubação por 96 horas a 35°C e ulterior adição do vermelho de metila.

5.6.4. Teste do TSI

No ágar TSI inoculou-se através de estriamento na superfície inclinada do bisel e picada profunda, incubando-se por 24 horas a 35°C.

No ágar TSI, estão presentes: glicose, lactose e sacarose, peptonas, aminoácidos, incluindo sulfurados, tiosulfato de sódio e citrato férrico amoniacal (indicador da produção de H₂S), com pH neutro e um indicador de pH, o vermelho de fenol. Como a glicose é um monossacarídeo e encontra-se em baixa concentração,

ocorre rapidamente à fermentação por meio anaeróbio, formando ácido no fundo do tubo, o que torna o meio amarelo pela viragem do indicador vermelho de fenol (todos os membros da família *Enterobacteriaceae* fermentam a glicose com produção de ácido).

A fermentação aeróbia da glicose, ocorrendo na superfície do bisel, resulta em ácido pirúvico, que logo é degradada a CO_2 e água. A maioria das *Salmonellas* não fermenta sacarose a lactose, não provocando alterações no meio TSI. Como a fonte de carbono utilizável (glicose) é rapidamente esgotada, a *Salmonella* passa a degradar aerobiamente o substrato proteico do meio, produzindo amoníaco (NH_3), o que confere ao meio um pH alcalino, alterando a coloração do bisel para rosa intenso.

A maioria das *Salmonellas* apresenta no TSI as seguintes reações:

1. Ácido na base, com ou sem produção de gás;
2. Alcalino ou inalterado no bisel ou
3. Com produção de sulfeto de hidrogênio.

5.6.5. Teste do LIA

O meio ágar LIA é semeado com agulha através de picada profunda, estriando na superfície inclinada do bisel. Realizou-se a incubação por 30 horas a 35°C .

Observou se houve descarboxilação da lisina pela alcalinização do meio, o que é demonstrado pela não alteração da cor do indicador presente. A atividade da enzima lisina descarboxilase é dependente do pH, sendo mais ativa em pH inferior a 5,5.

Acidifica-se o meio através da fermentação da glicose presente. Nesta etapa do processo, ocorre a viragem do indicador púrpura de bromocresol, de violeta para amarelo.

A descarboxilação da lisina confere à produção de uma diamina (cadaverina) e CO_2 , que resulta ao meio, características de alcalinidade e nova viragem da cor do indicador, que passa de amarelo para violeta. A diamina cadaverina é estável quando produzida em condições anaeróbias.

A maioria das salmonelas é capaz de produzir lisina descarboxilase.

5.6.6. Teste da Urease

Os tubos com caldo ureia foram inoculados com uma alçada de cultura provenientes do ágar nutriente e incubou-se por 24 horas a 35°C.

A capacidade de degradar a ureia pela enzima urease causa a viragem do meio, com mudança da cor do meio pêssego para cor-de-rosa escuro. *Salmonella* não produz urease.

5.6.7. Teste do Malonato

Tubos com caldo malonato foram inoculados com uma alçada de cultura em ágar nutriente e incubados por 24 horas a 35°C.

Este teste tem o objetivo de observar se o microrganismo é capaz de utilizar o malonato, como única fonte de carbono, levando a alteração da cor do meio com tonalidade verde para azul. Habitualmente, salmonela não usa malonato como fonte de carbono.

5.6.8. Teste da Fenilalanina

Inoculou-se o ágar fenilalanina por estriamento na superfície da rampa do meio inclinado e incubou-se por até 24 horas a 35°C. Após, adicionou-se 3 gotas de solução de cloreto férrico 10% e observou se houve alteração da cor da superfície do meio e da cultura para verde, indicando desaminação da fenilalanina, atividade não característica de *Salmonella*.

5.6.9. Teste SIM – Sulfeto, Indol e Motilidade

Inoculou-se tubos com meio SIM através de picada profunda e incubados por 24 horas a 35°C.

A motilidade é caracterizada pela propagação do crescimento por todo o meio. Se for limitado a linha de semeadura, indica que o microrganismo é imóvel. A maioria das *Salmonellas* apresenta motilidade positiva.

O meio SIM é o meio mais indicado para a averiguação da produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S). O H₂S é um gás incolor ocasionado pelo microrganismo em teste, através da redução do tiosulfato presente no meio. A revelação da presença de sulfeto de hidrogênio se realiza por meio da reação do H₂S com citrato de ferro e amônio (presente no meio), formando um precipitado negro insolúvel. A maioria das *Salmonellas* produz H₂S.

Depois da leitura da motilidade e da produção de sulfeto de hidrogênio, adicionou-se algumas gotas de reativo de Kovacs aos tubos para verificar se houve produção de indol. A oxidação do triptofano presente no meio SIM induz a formação de três principais compostos: indol, escatol e indol acetato.

A formação de um anel vermelho resulta da adição do reativo de Kovacs, efeito da reação entre indol e o dimetilaminobenzaldeído presente nesse reativo. Quase a totalidade das salmonelas não produz indol.

5.6.10. Teste Sorológico

Em uma lâmina de vidro depositou-se separadamente uma gota de solução salina 2% e uma gota de soro anti-*salmonella* polivalente “O”, diretamente do frasco. Após, acrescentou-se a cada uma delas uma alçada de cultura suspeita de *Salmonella* proveniente do tubo com ágar nutriente inclinado. Com movimentos circulares, realizou-se a leitura em 1 a 2 minutos, observando a existência de aglutinação, que foi classificada da seguinte maneira:

1. Positiva: presença de aglutinação somente na mistura cultivo + antissoro;
2. Negativa: ausência de aglutinação em ambas às misturas e
3. Não específica: presença de aglutinação em ambas às misturas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As amostras coletadas dos dois estabelecimentos mostraram-se com a temperatura adequada, já que se encontraram entre 2° e 3° C, ou seja, sob-refrigeração. As análises foram realizadas imediatamente após a coleta.

6.1. PESQUISA DE COLIFORMES A 35°C E 45°C

Embora não existam informações na legislação brasileira quanto aos limites de contagens para coliformes totais, tais análises foram realizadas considerando-se que os resultados positivos indicam más condições higiênicas do local, do produto e o risco de contaminação fecal. As contagens de coliformes a 35°C das amostras coletadas nos estabelecimentos A e B se apresentam na tabela 1.

Tabela 1 – Contagem de Coliformes a 35°C

Amostras	Resultados (UFC/g)
Local A	4,9x10 ⁴
Local B	3,5x10 ⁵

Pode-se observar, com base nos resultados apresentados na tabela 1, que os dois estabelecimentos pesquisados apresentaram contagem elevada para tais bactérias, o que pode evidenciar condições inadequadas de manipulação e higienização destas saladas.

Gasparello (2008), ao analisar folhas de alface, chicória, couve e almeirão retiradas de um restaurante *self-service*, na cidade de Campo Mourão (PR), encontrou altas contagens para Coliformes totais e termotolerantes, ambos acima de 10³ UFC/g. Saliencia-se que entre os motivos destes resultados é a utilização, ainda na horta, de água contaminada para a irrigação. A manipulação destas hortaliças durante a colheita e o transporte também são motivos para uma alta contaminação.

Com base nos resultados conquistados e expressos na tabela 1, deu-se continuidade com as análises, então para coliformes termotolerantes, conhecida também como coliforme a 45°C. Os resultados obtidos estão expressos na tabela 2.

Tabela 2 – Contagem de Coliformes a 45°C

Amostras	Resultados (UFC/g)
Local A	3×10^4
Local B	2×10^5

Para coliformes a 45° C a legislação brasileira (BRASIL, 2001) estabelece limite máximo de 10^2 UFC/g. Observa-se na tabela 2 uma alta contagem destes microrganismos nas saladas coletadas dos dois locais analisados, indicando que houve falhas na manipulação destas folhas, podendo ter ocorrido também uma contaminação pós-lavagem. Inúmeras práticas desapropriadas que ocorrem durante o processamento do alimento facilitam a contaminação, a sobrevivência e a multiplicação de microrganismos causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos. Deve-se possuir um conhecimento dos principais pontos de contaminação durante a confecção dos alimentos, essencial para assegurar qualidade microbiológica e segurança para o consumidor. Atualmente, a transmissão de doenças infecciosas por alimentos compõe um evento frequente, que, em algumas situações, pode mostrar elevada gravidade para um grande número de pessoas no Brasil e no mundo (VANSCONCELOS, 2004).

Resultados semelhantes aos aqui apresentados em relação à qualidade das saladas de serviços de alimentação, já foram relatados por outros autores. Nascimento e Marques (1998) ao analisarem saladas *in natura* servidas em restaurantes, observaram que 100% das amostras estavam fora do padrão estabelecido pela legislação para coliformes fecais.

Palú et al. (2002), em estudo da avaliação microbiológica de frutas e hortaliças frescas, servidas em restaurantes *self-service*, encontraram 12, das 15 amostras analisadas, em condições insatisfatórias. Destas, 7 ou seja, 53% eram amostras de alface com contagem de coliformes termotolerantes acima do limite máximo permitido pela legislação brasileira.

Almeida (2006) demonstrou ao analisar saladas *in natura* de restaurantes *self-service* no município de Limeira (SP), que 26% das amostras analisadas apresentaram contagens de coliformes fecais acima de 10^3 UFC/mL.

Os resultados apresentados no presente trabalho, corroborados pelos resultados encontrados por outros autores, demonstram que, muitas vezes, as condições higiênico-sanitárias dos estabelecimentos do setor de alimentação são precárias. Este fato reforça a necessidade de intervenção no processo de produção, manipulação e conservação dos alimentos.

A Segurança Alimentar é um desafio atual e destina-se à oferta de alimentos livres de agentes que possam colocar em risco a saúde do consumidor. Em virtude da complexidade dos fatores que afetam a questão, deve-se analisar sob o ponto de vista de toda a cadeia alimentar, desde a produção dos alimentos, passando pela industrialização, até a distribuição final ao consumidor (SOLIS, 1999).

6.2. CONTAGEM DE *STHAPHYLOCOCCUS* COAGULASE POSITIVA

A tabela 3 mostra os resultados das contagens de colônias típicas de *Staphylococcus sp* em meio Baird-Parker, ou seja, colônias pretas, com halo de transparência ao redor. Todavia, estes resultados não podem ser analisados isoladamente, já que não são confirmativos para *S. aureus*, necessitando então serem confirmados pelo teste de coagulase, segundo a Instrução Normativa nº 62, de 2001 (BRASIL, 2001). Além deste teste, realizaram-se também os testes de catalase e termonuclease, que podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 3 – Contagem de colônias típicas de *Staphylococcus* em meio Baird-Parker

Amostra	Resultados (UFC/g)
Local A	$6,5 \times 10^2$
Local B	$5,8 \times 10^2$

De acordo com os resultados da Tabela 4, pode-se excluir a presença de *S. aureus* coagulase positiva das amostras analisadas.

Resultados semelhantes foram relatados por Gasparello (2008), que em sua pesquisa de vegetais folhosos, também não encontrou *Staphylococcus* coagulase positiva em suas amostras de salada *in natura*.

Tabela 4 – Resultados das provas bioquímicas para *S. aureus* coagulase positiva

Amostra	Termonuclease	Coagulase	Catalase
Local A	-	-	-
Local B	-	-	-

A legislação RDC nº12 da ANVISA não menciona análise de enterotoxina estafilocócica em alimentos, exige apenas a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, para alguns produtos, a exemplo de conserva de ovos cozidos e em salmoura, hortaliças, legumes e similares, que forem branqueados, cozidos, secos ou desidratados. Pinto (2007) impõe que a presença de *Staphylococcus* mostra a falta de higiene, já que a origem principal das cepas produtoras desta enterotoxina é o portador humano, então sua presença em alimentos a serem consumidos crus é um importante indicador de saúde pública.

O gênero *Staphylococcus* é composto de 37 espécies, 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. Os estafilococos são geralmente encontrados na pele e mucosas do homem e de outros animais. Muitas espécies são isoladas de partes específicas do corpo humano ou de certos animais, por exemplo: *S. auricularis* encontrado como parte da microbiota humana do conduto auditivo e *S. hyicus* causando dermatite infecciosa em suínos. Os estafilococos são cocos Gram-positivos, podem se apresentar isolados ou aos pares, em cadeias curtas ou agrupados. O aspecto macroscópico da colônia em meio sólido, presença de pigmento e hemólise em ágar sangue de carneiro são características auxiliares na identificação destes microrganismos. São imóveis, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e produtores de catalase (JAY, 2005).

Rotineiramente, o teste da catalase é utilizado para diferenciar os estafilococos (catalase positiva) dos estreptococos (catalase negativa). Entretanto, existem relatos na literatura de *Staphylococcus aureus* catalase negativa relacionados a processos infecciosos, embora raros, descritos em vários países, inclusive no Brasil. A catalase constitui um mecanismo de defesa para a bactéria contra células fagocitárias, porém não é um fator essencial para a sobrevivência do *S. aureus* (ANVISA, 2014). A identificação da espécie de estafilococos é baseada em uma variedade de características fenotípicas convencionais. As espécies mais importantes do ponto de vista clínico podem ser identificadas com algumas provas

específicas. A habilidade de coagular o plasma continua sendo o critério mais aceito e utilizado para identificar estafilococos patogênicos associados com infecções agudas, em geral, *S. aureus* em humanos e animais e *S. intermedius* e *S. hyicus* em animais (ANVISA, 2014).

6.3. PESQUISA DE SALMONELLA

Não foi detectado a presença de *Salmonella sp* nas amostras de saladas adquiridas nos dois estabelecimentos de Campo Mourão. Todavia, algumas colônias obtidas no meio XLD, consideradas suspeitas, foram repicadas e submetidas à provas bioquímicas. A tabela 5 mostra os resultados das provas bioquímicas para pesquisa de *Salmonella* das amostras coletadas. Comparando estes resultados com as características bioquímicas das principais espécies de *Salmonella* patogênicas (apresentado no ANEXO 1), podemos observar que todos os resultados foram atípicos.

Tabela 5 – Resultados das provas bioquímicas para pesquisa de *Salmonella*.

Amostra	LIA	Urease	TSI	SIM			Fenil	VM	VP	Citrato	Malonato
				MOTI	H ₂ S	INDOL					
1	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+
1a	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
1b	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
2	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
2a	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
2b	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+

Os resultados de 1 ao 1b equivalem a amostra coletada do local A, e o resultado 2 ao 2b equivalem a amostra coletada do local B.

Após obter esses resultados, foi feito teste bioquímico sorológico, onde não se obteve aglutinação da junção do soro com a amostra, apresentando um resultado não característico de *Salmonella*. Esses resultados estão expressos na tabela 6.

Apesar de não encontrar *Salmonella* nestas amostras de salada *in natura*, é importante que se realize a pesquisa para este tipo de microrganismo, independente da maneira que este alimento será consumido, pois a *Salmonella* é uma bactéria de ampla ocorrência, onde as principais fontes são a água, o solo, as fezes de animais utilizadas como esterco, as superfícies de equipamentos e utensílios de cozinhas.

Tabela 6 – Teste bioquímico sorológico com amostra de *Salmonella*.

Amostra	Teste Sorológico – anti O
Local A	negativo
Local B	negativo

Resultados semelhantes aos aqui obtidos foram relatados por outros autores. Damasceno et al. (2002), avaliando as condições higiênico sanitárias de restaurantes do tipo *self-service*, constataram a ausência de *Salmonella* em 25 gramas de amostra de saladas cruas analisadas. Da mesma maneira, Almeida (2006) não detectou a presença de *Salmonella* em nenhuma amostra de alface coletadas de sete restaurantes. Machado et al. (2009), ao realizar, em alfaces, a análise de coliformes a 35°C e *Salmonella* no restaurante de uma empresa localizada no município de Aparecida de Goiânia (GO), também não encontrou resultados positivos.

Todavia, Gasparello (2008), ao analisar alguns vegetais folhosos, entre eles alface, provenientes de restaurantes *self-service*, em Campo Mourão (PR), as encontrou fora do padrão estabelecido pela RDC nº 12 (2001), apresentando ao menos, uma colônia de *Salmonella*. Entretanto, ao se realizar as provas bioquímicas características para este tipo de microrganismo, não foi observado aglutinação sorológica, utilizando o soro anti O, então, não sendo possível confirmar a presença de *Salmonella*.

7. CONCLUSÃO

Observou-se que as amostras encontram-se fora dos padrões estabelecidos pela ANVISA através da Resolução RDC nº 12, 2 de janeiro de 2001, que estabelece os Padrões Microbiológicos Sanitários para alimentos, no que se diz respeito ao limite de Coliformes termotolerantes. Conclui-se que os locais onde foram coletadas as amostras de alface não se encontram em condições adequadas para manipular e comercializar alimentos, possuindo, possivelmente, graves falhas na higienização dos vegetais folhosos.

A ANVISA não determina a pesquisa de *Staphylococcus aureus* neste tipo de alimentos, porém observaram-se a alta contagem deste microrganismo nas amostras.

Nenhuma amostra apresentou presença de *Salmonella* spp. Porém, é necessário que haja um melhor cuidado com os alimentos manipulados para evitar o crescimento deste microrganismo nestes alimentos.

É de grande interesse para a saúde pública que pesquisas de ocorrência continuem a ser estudados em todas as regiões do país, para que então, a atenção seja redobrada.

Com base nesses resultados, salienta-se a importância de informação e treinamento para os manipuladores, pois eles desempenham um papel importante na sociedade, sendo responsáveis pelas infecções alimentares e estas, por sua vez podem ou não levar a óbito.

É indicado que sejam realizados trabalhos posteriores, como outras coletas em dias alternados, para se obter resultados mais concretos.

É de interesse da comunidade, que fossem realizados palestras e cursos com os manipuladores de alimentos para evitar esses resultados e uma contaminação alimentar.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKUTSU, Rita de C. **Adequação das boas práticas de fabricação em serviços de alimentação.** Rev. Nutr., Campinas, v. 18, n. 3, p. 419-427, 2005.

ALMEIDA, M. T. T. de. **Avaliação microbiológica de alfaces (*Lactuca sativa*) em restaurantes self-service no município de Limeira-SP.** Piracicaba, 2006. Dissertação de Mestrado. 92 f.

ARRUDA, G. A. **Implantando Qualidade nos Restaurantes de Coletividade.** Revista Nutrição em Pauta. Março/abril de 1999.

BARUFFALDI, R.; PENNA, T. C. V.; MACHOSHVILI, I. A.; ABE, L. E. **Tratamento químico de hortaliças poluídas.** Rev. Saúde Pública, v. 18 n. 3, p. 225-34, 1984.

BEUCHAT, L. R. **Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables.** Microbes and Infection, v. 4, p.413-423, 2002.

BOBIO; F. O.; BOBIO, P. A. **Química do processamento de alimentos.** 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 151p.

BRASIL, Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa 62, de 2003.** Acesso em: 06/05/2014. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/audes/manuais/microbiologia/mod_4_2004.pdf>

BRASIL, Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **Resolução ANVISA - RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001.** Acesso em: 06/05/2014. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES>

BRASIL, Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **Resolução ANVISA - RDC Nº 216, de setembro de 2004.** Acesso em: 06/05/2014. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES>

BRASIL, Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **Staphylococcus spp.** Acesso em: 21/07/2014. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/audes/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/intr_sta.htm>

Brasil, Ministério da Saúde. **Mortalidade no Brasil.** Brasília: CENEPI/FUNASA, 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil.** 2007. Acesso em: 06/05/2014. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresentacao_dta.pdf

BRASIL, Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **Resolução ANVISA - RDC Nº 275, de 21 de outubro de 2002.** Acesso em: 06/05/2014. Disponível em: <<http://anvisa.gov.br>>

CARDOSO, T. G.; Carvalho, V. M. de. **Toxinfecção alimentar por *Salmonella spp.***. Ver Inst Ciênc Saúde, 2006; 2ª Ed. v. 24, 95-101 p.

CHAGAS, S. D. **Bactérias indicadoras de poluição fecal em águas de irrigação de hortas que abastecem o município de Natal — Estado do Rio Grande do Norte (Brasil).** Rev. Saúde públ., S. Paulo, 42 p., 1981.

DAMASCENO, KSFSC; ALVES, MA; FREIRE, IMG; TORRES, GF; AMBRÓSIO, CLB; GUERRA, NB. **Condições Higiênico-sanitárias de “self-services” do entorno da UFPE e das saladas cruas por eles servidos.** Revista Higiene Alimentar, v. 16, p. 102-103, 2002. *Apud* CARDOSO, T. G.; CARVALHO, V. M. de. **Toxinfecção Alimentar por *Salmonella spp.*** Revista Instituto Ciência Saúde, v. 24, p. 95-101, 2006.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Hortaliças minimamente processadas.** Brasília: Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças, 2003. 133 p.

EVANGELISTA, J. **Alimentos – Um estudo abrangente.** São Paulo: Atheneu, 2002.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos.** 2. Ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 466.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The special programme for food security.** Acesso em: 06/05/2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/spfs/>>.

FARCHE, Lívia Maria, et al. **O panorama higiênico-sanitário nas cozinhas das escolas da rede pública de Franca, SP.** Revista Higiene Alimentar. v. 21, n.154, p.27-29. São Paulo, set., 2007.

FONTANA, Nuria. **Atividade antimicrobiana de desinfetantes utilizados na sanitização de alface.** 2006. 26 f. Trabalho de conclusão de curso. Centro Universitário Franciscano - Unifra, Santa Maria, 2006.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu; 2004.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos.** São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 182p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Fatores intrínsecos e extrínsecos que controlam o desenvolvimento microbiano nos alimentos.** Atheneu, p. 13-25. São Paulo: 1996. *Apud* CARDOSO, T. G.; CARVALHO, V. M. de. **Toxinfecção Alimentar por *Salmonella spp.*** Revista Instituto Ciência Saúde, v. 24, p. 95-101, 2006.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

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

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los alimentos**. 4. ed. Zaragoza: Acribia, 1993.

GASPARELO, E. A. **Pesquisa de Coliformes a 35°C e 45°C, estafilococos coagulase positiva, e presença de Salmonelas em saladas vegetais folhosos servidos *in natura* em restaurantes no município de Campo Mourão**. 65 p. Monografia apresentada ao I Curso de Vigilância Sanitária de Alimentos, 2008. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campo Mourão – PR.

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

GERMANO, P. M. L., GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos**. Barueri, SP: Manole, 2008. 229-230; 317 p.

GÓES, J. A., et al. **Capacitação dos manipuladores de alimentos e a qualidade da alimentação servida**. *Revista Higiene Alimentar*. São Paulo, mar., 2001. v.15, n.82, p. 20-22.

GOMES, M. J. P. **Enterobacteriaceae (*Salmonella* spp)**. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/pdf/salmonella200901.pdf>>. Acesso em: .

HATAKKA, M.; BJÖRKROTH, K.J.; ASPLUD, K. et al. **Genotypes and enterotoxigenicity of isolated from the hands and nasal cavities of flight-catering employees**. *J. Food Protect*, 2000. 11, 1487-1491 *apud* Silva, Bruna Lourenço da. **Avaliação higiênico-sanitária de produtos minimamente processados comercializados em Botucatu/SP - Perfil genotípico e fenotípico das cepas de staphylococcus sp, em relação à produção de biofilme e de enterotoxinas**. [s.n.], 2013

HITCHINS, A. D.; HARTMAN, P. A.; TODD, E. C. D. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods: Coliforms-Escherichia coli and its toxins**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1996. p.325-369 *apud* CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; CASTRO, A.G.M.; KANASHIRO, A.M.I.; GAMA, N.M.S.Q. **Pesquisa de coliformes totais e coliformes fecais analisados em ovos comerciais no laboratório de patologia avícola de descaldado**. *Ark. Inst. Biol.*, São Paulo, 2001. v.68, n.1, p.19-22, jan./jun.

HOLT, P.S. Effect of induced molting on the susceptibility of white leghorn hens to a *Salmonella* Enteritidis infection. *Aviandiseases*, v.87, p.412-417. 1992 *apud* FRANCO, R. M. F. ***Escherichia coli*: ocorrência em suínos abatidos na Grande**

rio e sua viabilidade experimental em linguiça frescal tipo toscana. Niterói-RJ, 2002.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos.** Porto Alegre: Editora Artmed, 2005 p. 712.

JAY, J. M. **Microbiologia moderna de los alimentos.** 3ª ed. Zaragoza: Acribia, 1992 *apud* CARDOSO, T. G.; CARVALHO, V. M. de. **Toxinfecção Alimentar por *Salmonella spp.*** Revista Instituto Ciência Saúde, v. 24, p. 95-101, 2006.

KONEMAN, E. et al. **Diagnóstico microbiológico.** 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 11, parte 1.

LE MINOR, L. Genus *Salmonella* In: KRIEG, N. R.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Baltimore, the William and Wilkins Co. v.II, 1984. *apud* FRANCO, R. M. **Escherichia coli: ocorrência em suínos abatidos na Grande rio e sua viabilidade experimental em linguiça frescal tipo toscana.** Niterói - RJ, 2002.

LEITÃO, M. F. de F. Microbiologia e deterioração do pescado fresco e refrigerado de origem fluvial ou marinha. In: Simpósio sobre controle de qualidade microbiológico, químico, físico e organoléptico de pescado e derivado, 1994, Campinas. Anais. Campinas: ITAL, 1994. p.11- 26 *apud* SILVA JUNIOR, Eneo Alves da. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Serviços de Alimentação.** 6.ed. São Paulo: Varela, 1995.

LOURENÇO, M. C. S.; REIS, E. F. M.; VALLS, R. ***Salmonella* entérica e sorogrupo O:16 em um paciente HIV positivo: relato de caso.** Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2004; v. 3. 169-170 p.

MARMENTINI, R. P.; RONQUI, L.; ALVARENGA, V. O. **A importância das boas práticas de manipulação para os estabelecimentos que manipulam alimentos.** Universidade Federal de Rondônia – UNIR – Campus Ariquemes, 2011. 11 p.

MACHADO, S. S. et al. **Contribuição à análise de perigos na produção de alface.** Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.11, n.2, p.191-198, 2009

MAISTRO, L. C. **Alface Minimamente processada.** Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Metodista de Piracicaba. Rev. Nutr., Campinas, v. 14, n. 3, 219-224, set./dez., 2001

MELO, M. A. F., et al. **Avaliação das condições higiênico-sanitárias dos estabelecimentos comercializadores de caldo de cana da cidade de Ponta Grossa - PR.** V Semana de Tecnologia em Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. v. 2, n.1. mai., 2007.

MICHE, M. P.; MORGANTI, L. E. **Parasitas em alfaces comercializadas na cidade de São Paulo.** In: Congresso da Federación Latinoamericana de Parasitólogos, Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia. Jornada Paulista de

Parasitologia. São Paulo, 2005. Resumos. São Paulo, Sociedade Brasileira de Parasitologia, 2005. p. 120.

MORETTI, C. L. **Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2007. 531 p.

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.

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 – RJ**. Higiene Alimentar, São Paulo, v. 16, n. 100, p. 67-75, set. 2002.

PADHYE, N. V.; DOYLE, M. P. *Escherichia coli* O157:H7: epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food. Journal of Food Protection, v. 55, p. 555–559, 1995 *apud* FRANCO, R. M. F. ***Escherichia coli*: ocorrência em suínos abatidos na Grande rio e sua viabilidade experimental em linguiça frescal tipo toscana**. Niterói - RJ, 2002.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. Ciência, higiene e tecnologia da carne: Riscos microbiológicos da carne, Goiânia: UFG, 1995. v.1, 294-308 p.

PELCZAR, J. R. M. J., CHAN, E. C. S., KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceito e aplicações**. São Paulo-SP: McGraw-Hill, v.2, 1997. Cap. 30, 371-397 p.

PINTO, D. M. **Qualidade de produtos minimamente processados comercializados em diferentes épocas do ano**. Lavras – MG, 2007. 127 p. Dissertação (Mestrado em Ciencia dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras.

POPOFF, M. & LE MINOR, L. Y. **Request for an Opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp.** As the type and only species of the genus Salmonella, 2005. Int J Syst Bacteriol, 465–468 f.

PREFEITURA MUNICIPAL DE CAMPO MOURÃO, PARANÁ. **A Cidade**. Acesso em: 06/05/2014. Disponível em: <<http://www.campomourao.pr.gov.br/?p=YWxyb3RsaXMvaV9jYWRpZG9Aemh6>>

RAY, B. **Fundamental food microbiology**. Boca Raton: CRC Press, 1996. 516p. *apud* Silva, Maria Cecília da. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema SimPlate**. 2002, 75 f. 2002. Dissertação (mestrado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

RIEDEL, G. **Controle sanitário dos alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1992, p. 320. ROBINS-BROWNE, R. M.; TZIPORI, S.; GONIS, G.; HAYES, J.; WITHERS, M.; PRPIC, J. K. **The pathogenesis of *Yersinia enterocolitica* infection in gnotobiotic piglets**. J Med. Microbiol., v.19, p.297-308, 1987 *apud* FRANCO, R. M.

F. ***Escherichia coli***: ocorrência em suínos abatidos na Grande rio e sua viabilidade experimental em linguiça frescal tipo toscana. Niterói - RJ, 2002.

RODRIGUES, K. L.; GOMES, J. P.; CONCEIÇÃO, R. C. dos S.; BROD, C. S.; CARVALHAL, J. B.; GUIMARÃES, J. A. G. **Condições higiênico-sanitárias no comércio ambulante de alimentos em Pelotas - RS**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 23, n. 3, p. 447 – 452, 2003.

SANTOS, I.; PEDROSO, L. **Contaminação dos produtos vegetais pela água**. Segurança e qualidade alimentar. Lisboa. v. 7, p. 11-13, 2009.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**. Campinas: ITAL, 1995. 228 f.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2. ed. rev. ampl. São Paulo: Livraria Varela Ltda., 2001. 317 f.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA, 1995. 159 f.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed; 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, L. F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu; 2004.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo, 2001.

VICENTE, A. M. Manual de indústrias dos alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 1995, *apud* MELO, Mariane Aparecida Faragode, et al. **Avaliação das condições higiênico-sanitárias dos estabelecimentos comercializadores de caldo de cana da cidade de Ponta Grossa-PR**. V Semana de Tecnologia em Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. v. 2, n.1, 2007.

VIEGAS, Silvia Judite. **Alterações do estado de saúde associadas à alimentação: contaminação microbiológica dos alimentos**. Silvia Judite Viegas. – Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Departamento de Alimentação e Nutrição. Unidade de Observação e Vigilância, 2009. - 32 f.

9. ANEXO

ANEXO A – Principais características das espécies de *Salmonella* e de alguns sorotipos importantes epidemiologicamente (Popoff & Le Minor, 2005)

TESTE	S. entérica subsp. entérica	S. serovar Choleraesuis	S. serovar Gallinarum	S. serovar Paratyphi A	S. serovar Pullorum	S. serovar Typhi	S. entérica subsp. Arizonae	S. entérica subsp. Diarizonae	S. subs. Houtenae	S. entérica subsp. Indica	s. entérica subsp. Salamae	s. bongori
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose ácida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	- (99)	-	-	-	-	- (99)	- (85)	+ (85)	-	- (78)	- (99)	-
Sacarose	- (99)	-	-	-	-	-	- (99)	- (95)	-	-	- (99)	-
H ₂ S	+ (95)	+/- (50/50)	+	- (90)	+ (90)	+ (97)	+ (99)	+ (99)	+	+	+	+
Lisina	+ (98)	+ (95)	+ (90)	-	+	+ (98)	+ (99)	+ (99)	+	+	+	+
Urease	- (99)	-	-	-	-	-	-	-	- (98)	-	-	-
Malonato	-	-	-	-	-	-	+ (95)	+ (95)	+	+	+ (95)	+
Indol	- (99)	-	-	-	-	-	- (99)	- (98)	-	-	- (98)	-
VM	+	+	+	+	+ (90)	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	+ (95)	- (75)	-	-	-	-	+ (99)	+ (98)	+ (98)	+ (89)	+	+ (94)
Fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilidade	+ (95)	+ (95)	-	- (95)	-	+ (97)	+ (99)	+ (99)	+ (98)	+	+ (98)	+

+ = 100% das cepas são positivas, exceto quando outra porcentagem estiver especificada entre parênteses.

- = 100% das cepas são positivas, exceto quando outra porcentagem estiver especificada entre parênteses.