

AGNES MARIA CUPERTINO FERNANDES ARAUJO

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E PROCESSO DE
HIGIENIZAÇÃO DE ALFACE CRESPA (*Lactuca sativa* var.
crispa) CONSUMIDA EM UMA UNIDADE DE
ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO HOSPITALAR



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
JUNHO/2019**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor Marco Antônio Lemos Miguel

CIP - Catalogação na Publicação

A658c

Araujo, Agnes Maria Cupertino Fernandes
CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E PROCESSO DE
HIGIENIZAÇÃO DE ALFACE CRESPA (Lactuca sativa var.
crispa) CONSUMIDA EM UMA UNIDADE DE ALIMENTAÇÃO E
NUTRIÇÃO HOSPITALAR / Agnes Maria Cupertino
Fernandes Araujo. -- Rio de Janeiro, 2019.
65 f.

Orientador: Marco Antônio Lemos Miguel.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2019.

1. higienização. 2. cloro. 3. alface. 4. reúso.
I. Miguel, Marco Antônio Lemos, orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

FOLHA DE APROVAÇÃO

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

ALUNO: **Agnes Maria Cupertino Fernandes Araujo**
DRE: 115024515

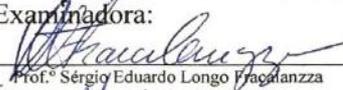
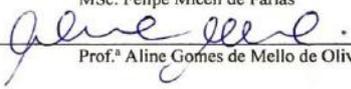
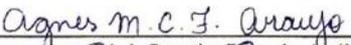
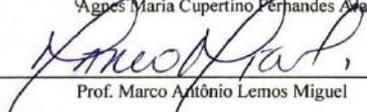
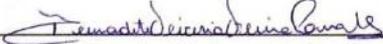
BANCA EXAMINADORA: Prof.º Sérgio Eduardo Longo Fracalanza (Presidente)
MSc. Felipe Miceli de Farias
Prof.ª Aline Gomes de Mello de Oliveira
Prof.ª Raquel Regina Bonelli (Suplente)

Título da Monografia: **“Características microbiológicas e processo de higienização de alface crespa (*Lactuca sativa* var. *crispa*) consumida em uma unidade de alimentação e nutrição hospitalar”**

Local: Sala da Pós-Graduação E1-044/ CCS / UFRJ
Data e hora de início: 25 de junho de 2019 às 09:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 25 de junho de 2019.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>10,0</u>	 Prof.º Sérgio Eduardo Longo Fracalanza
<u>10,0</u>	 MSc. Felipe Miceli de Farias
<u>10,0</u>	 Prof.ª Aline Gomes de Mello de Oliveira
	Prof.ª Raquel Regina Bonelli
Aluno:	 Agnes Maria Cupertino Fernandes Araujo
Orientador:	 Prof. Marco Antônio Lemos Miguel
Coordenador de TCC	 Prof.ª Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Dedico este trabalho aos meus pais, Regina e Luiz e ao meu irmão Argus minha maior força na vida, que compreenderam os momentos de ausência e contribuíram com essa conquista. Incondicional é o meu amor por vocês. À minha eterna amiga Alexssandra (*in memoriam*) por me trazer amor e fé na sua caminhada. Sua lembrança me inspira e me faz persistir.

AGRADECIMENTOS

Por mais árdua que tenha sido essa trajetória, tive o incentivo e apoio de muitas pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho. Gostaria de prestar meus sinceros agradecimentos:

Ao meu querido professor Marco Antônio Lemos Miguel, por receber-me num momento tão delicado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, além de acreditar no meu potencial. Por toda sua ajuda e paciência no desenvolvimento deste projeto. Agradeço pelo aprendizado, experiência de vida e crescimento pessoal que pude adquirir ao trabalhar com uma equipe maravilhosa. É uma honra ser sua aluna. Levo para mim o exemplo do espírito de parceria, do compartilhar, da ajuda e da soma proporcionado por você no Laboratório.

Ao Antônio Carlos dos Santos, agradeço pela ajuda e simpatia desde o início. Por transmitir calma e serenidade quando o desespero era grande e os experimentos pareciam não ter fim. Você continua sendo o Santo Antônio que está sempre disposto a nos amparar no que for preciso.

À minha amiga do coração, Gisele Ferreira Santos, nossa amizade tornou mais leve as responsabilidades deste grande projeto. Meu sentimento por você sempre será de gratidão, por me confiar a sua família e acreditar na minha índole. Espero que nossa cumplicidade continue sendo forte.

Agradeço também ao Prof.º Dr.º Sergio Eduardo Longo Fracalanza pelo carinhoso apoio e incentivo durante toda a minha graduação. É um privilégio aprender com você.

Às prof.ª Dr.ª Aline Gomes de Mello de Oliveira e Raquel Regina Bonelli, obrigada por participarem da banca examinadora. Sinto-me muito honrada.

À toda equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, sempre prestativa e atenciosa, em especial ao doutorando Felipe Miceli de Farias, de incansável disposição em ajudar. Agradeço pelos cafés e pela agradável companhia. Sua gentileza e empenho refletem o caminho para o sucesso.

Gostaria de deixar meus sinceros agradecimentos ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, corpo docente, direção e administração pela competência no processo de formação profissional. Sobretudo, ao André Luis Amandula, obrigada por me esclarecer tantas dúvidas e ser tão atencioso.

Aos meus queridos tios, Marcelo Alves Fernandes e Elizabeth Rodrigues Fernandes, fundamentais na minha formação acadêmica que não medem esforços para ajudar. Os corações mais grandiosos e bondosos que já existiram.

Aos meus familiares e amigos, essenciais em minha vida. Sou grata por me incentivarem a ser uma pessoa melhor e não desistir dos meus sonhos.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação.

RESUMO

AGNES MARIA CUPERTINO FERNANDES ARAUJO

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E PROCESSO DE HIGIENIZAÇÃO DE ALFACE CRESPA (*Lactuca sativa* var. *crispa*) CONSUMIDA EM UMA UNIDADE DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO HOSPITALAR

Orientador: Prof.º Dr.º Marco Antônio Lemos Miguel

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso

Em decorrência das mudanças socioeconômicas nos últimos anos, principalmente no estilo de vida da população, ocorreu um aumento significativo da alimentação fora do lar. Em consequência, intensificaram-se a quantidade de serviços de alimentação, como as Unidades de Alimentação e Nutrição (UAN), restaurantes entre outros serviços de refeições. Os novos hábitos alimentares colaboram em parte para uma alimentação desequilibrada, porém é crescente a preocupação da população com atributos de qualidade dos alimentos e dos serviços de alimentação. As hortaliças são recomendadas na dieta alimentar uma vez que possuem propriedades benéficas relacionadas à promoção da saúde. Entre os folhosos, a alface é considerada o vegetal com maior destaque quanto ao consumo e importância econômica no mundo. Usualmente consumida crua, a alface pode ser considerada potencial veículo de microrganismos patogênicos. O risco pode ocorrer durante todas as etapas de produção. Em UAN, local que envolve atividades de armazenamento, manipulação, preparo de grandes volumes de alimentos e distribuição de refeições, este risco aumenta. Como medidas preventivas da veiculação de patógenos por alimentos são utilizadas metodologias padronizadas e produtos que objetivam reduzir a carga de patógenos a níveis seguros. Os compostos clorados são os mais utilizados e possuem maior estabilidade em solução, mesmo na presença da matéria orgânica, o que leva a recomendação do reúso da solução clorada por alguns fabricantes na redução de custos operacionais e de tempo. Este estudo tem como objetivo avaliar o processo de higienização de alface crespa em uma UAN Hospitalar. O estudo realizado em 10 dias distintos foi conduzido em duas etapas: a 1ª etapa contemplou a verificação do processo de higienização de hortaliças. A 2ª etapa foi experimental e consistiu na avaliação da eficácia do processo de higienização de hortaliças na UAN e no laboratório, bem como o reúso da solução clorada. Na avaliação do processo de higienização foram evidenciadas falhas no tratamento dos vegetais. As alfaces recebidas na UAN apresentaram contagens de bactérias mesófilas acima de 10^6 UFC/g. Para coliformes totais 80% das amostras estavam acima de 10^3 NMP/g, e para os coliformes termotolerantes foram detectadas contagens superiores a 10^2 NMP/g em duas amostras. As alfaces higienizadas na UAN resultaram na redução da contagem de bactérias mesófilas superior a 1 log UFC/g em 40% dos experimentos. No laboratório esta redução foi obtida em 100% dos experimentos. Em relação aos coliformes totais foi observada uma redução de 1 log NMP/g em 90% das

amostras higienizadas na UAN e em 100% quando o processo foi realizado no laboratório. Para os coliformes termotolerantes houve redução de 1 log em 3 das 7 amostras em que estes microrganismos foram detectados na UAN e em 4 das 7 amostras nos processos realizados no laboratório. Quanto ao reúso, a solução reutilizada foi eficaz contra *Escherichia coli*, mas não mostrou efeito significativo contra *Listeria* sp. Este estudo mostrou que as falhas ocorridas são decorrentes da falta de capacitação dos manipuladores e sistematização dos processos. Os resultados sugerem a inclusão de microrganismos como *Listeria monocytogenes* nos testes de avaliação de compostos antimicrobianos na indústria de alimentos.

Palavras-chave: higienização, cloro, alface, reúso, *Listeria* sp., *Escherichia coli*

ABSTRACT

AGNES MARIA CUPERTINO FERNANDES ARAUJO

MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND HYGIENE PROCESS OF GREEN LEAF LETTUCE (*Lactuca sativa* var. *crispa*) CONSUMED IN A FOOD AND NUTRITION HOSPITAL UNIT

Advisor: Prof.º Dr.º Marco Antônio Lemos Miguel

Abstract of the Monography presented at the Paulo de Góes Institute of Microbiology of the Federal University of Rio de Janeiro, as part of the requirements for obtaining the Bachelor's Degree in Biological Sciences: Microbiology and Immunology and approval in the RCS

As a result of the socioeconomic changes in the last years, mainly in the lifestyle of the population, a significant increase of the feeding outside the home occurred. As consequence, it increased the amount of food services, such as Food and Nutrition Units (FNU), restaurants and other meal services. The new eating habits contribute in part to an unbalanced diet, but the population's concern with food quality and food service attributes is growing. Vegetables are recommended in the diet as they have beneficial properties related to health promotion. Among leafy leaves, lettuce is considered the vegetable with the greatest importance in terms of consumption and economic importance in the world. Usually eaten raw, lettuce may be considered a potential vehicle for pathogenic microorganisms. Risk can occur during all stages of production. In FNU, a place that involves activities of storage, handling, preparation of large volumes of food and distribution of meals, this risk increases. As preventive measures for the transmission of pathogens by food, standardized methodologies and products are used that aim to reduce the pathogen burden to safe levels. Chlorinated compounds are the most used and have higher stability in solution, even in the presence of organic matter, which leads to the recommendation by some manufacturers to reuse the chlorinated solution in order to reduce operational costs and time. This study aims to evaluate the process of hygiene of green leaf lettuce in a FNU Hospital. The study carried out on 10 distinct days was conducted in two stages: the first stage contemplated the verification of the process of vegetables sanitation. The second stage was experimental and consisted in the evaluation of the efficacy of the hygiene process of vegetables in the FNU and in the laboratory, as well as the reuse of the chlorinated solution. In the evaluation of the sanitation process, there were evidences of failures in the treatment of the vegetables. Lettuces received at the FNHU showed counts of mesophilic bacteria above 10^6 CFU/g. For total coliforms, 80% of the samples were above 10^3 MPN/g, and for thermotolerant coliforms, counts above 10^2 MPN/g were detected in two samples. The lettuces hygienized in the FNU resulted in the reduction of the counts of mesophilic bacteria higher than 1 log CFU/g in 40% of the experiments. In the laboratory, this reduction was obtained in 100% of the experiments. In relation to the total coliforms, a reduction of 1 log MPN/g was observed in 90% of the hygienized samples in the FNU and 100% when the process was performed in the laboratory. For the thermotolerant coliforms there was a reduction of 1 log in 3 of the 7 samples in which these microorganisms were detected in the FNU and in 4 of the 7 samples in the processes carried out in the laboratory. As for reuse, the reused solution was effective against

Escherichia coli, but showed no significant effect against *Listeria* sp. This study showed that the failures occurred are due to the lack of capacitation of the manipulators and systematization of the processes. The results suggest the inclusion of microorganisms as *Listeria monocytogenes* in the evaluation of antimicrobial compounds in the food industry.

Key-words: sanitation, chlorine, lettuce, reuse, *Listeria* sp., *Escherichia coli*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Processo de higienização de alface realizado na UAN e o processo realizado no laboratório.....19
- Figura 2** – Avaliação da eficácia da solução clorada de primeiro uso e da solução clorada de reuso em alfaces intencionalmente contaminadas com *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Escherichia coli* ATCC 11229.....23
- Figura 3** – Características microbiológicas (bactérias mesófilas) em alfaces recebidas e submetidas à higienização na UAN e no laboratório. Resultado das 10 análises das unidades amostrais.....27
- Figura 4** - Sobrevivência de *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Escherichia coli* ATCC 11229 em folhas de alface após tratamento com solução clorada de primeiro uso e de reuso.....33

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Principais perigos físicos, químicos e biológicos encontrados na cadeia produtiva de vegetais.....6
- Quadro 2** – Etapas do processo de higienização de hortaliças e frutas.....9
- Quadro 3** – Formulário de Avaliação do Processo de Higienização de Hortaliças.....17

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Composição físico-química da alface.....3
- Tabela 2** – Percentual de adequação do processo de higienização de hortaliças na UAN hospitalar durante 10 dias.....25
- Tabela 3** – Características microbiológicas de alfaces submetidas à higienização em diferentes condições.....28
- Tabela 4** - Comparação do processo de higienização realizado em condições de rotina da UAN.....29
- Tabela 5** - Comparação do processo de higienização realizado em condições de laboratório.....29
- Tabela 6** - Comparação do processo de higienização realizado em condições de rotina da UAN e em laboratório.....31
- Tabela 7** – Concentração média de solução de dicloroisocianurato de sódio e tempo médio de sanitização em diferentes condições de tratamento de alfaces.....32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABERC	Associação Brasileira de Refeições Coletivas
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABSEM	Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudanças
AH1	Alfaves higienizadas na UAN
AH2	Alfaves higienizadas no laboratório
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Ágar Padrão para Contagem
APHA	<i>American Public Health Association</i> (Associação Americana de Saúde Pública)
AR	Alfaves recebidas na UAN
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Coleção Americana de Cultura)
BHI	<i>Brain heart infusion</i> (Infusão cérebro e coração)
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
CEASA	Central Estadual de Abastecimento
COE	Controle Operacional Essencial
CVS	Centro de Vigilância Sanitária
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> (Agência de Proteção Ambiental)
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)
FAPHH	Formulário de Avaliação do Processo de Higienização de Hortaliças
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração de Comidas e Remédios)
FOS	Frutooligossacarídeos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBM	<i>International Business Machines</i> (Máquinas de Negócios Internacionais)
ICMSF	<i>International Commission on Microbiological Specifications for Foods</i> (Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos)
IEA	Instituto de Economia Agrícola
IT	Instruções de Trabalho
Log	Logaritmo
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
NBR	Norma Brasileira
NMP	Número Mais Provável
PCB	Bifenilpoliclorado
pH	Potencial hidrogeniônico
POF	Pesquisa Brasileira de Orçamentos Familiares
POP	Procedimento Operacional Padrão
ppm	Parte por milhão
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i> (Pacote Estatístico para as Ciências Sociais)
UAN	Unidade de Alimentação e Nutrição
UFC/g	Unidade Formadora de Colônia por grama
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por mililitro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UI	Unidades Internacionais
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Novos hábitos alimentares: o crescimento da alimentação fora do lar.....	1
1.2 Características, propriedades funcionais e nutricionais da alface.....	2
1.3 Principais sistemas de cultivo de alface.....	4
1.4 Aspectos relacionados à segurança no consumo de hortaliças.....	5
1.5 Higienização de hortaliças em UAN.....	9
2 JUSTIFICATIVA	14
3 OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo geral.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Local de estudo.....	16
4.2 Verificação do processo de higienização de hortaliças realizado na UAN hospitalar utilizando um formulário de inspeção.....	16
4.3 Origem das amostras de alface e preparo da solução clorada.....	17
4.4 Definição das unidades amostrais e avaliação da higienização.....	18
4.4.1 Análises microbiológicas das amostras das alfaces e da solução clorada.	20
4.4.1.1 <i>Contagem de bactérias aeróbias mesófilas totais</i>	20
4.4.1.2 <i>Determinação do NMP de coliformes totais e termotolerantes</i>	21
4.4.1.3 <i>Pesquisa enzimática de coliformes totais e termotolerantes</i>	21
4.5 Investigação do efeito da solução clorada de dicloroisocianurato de sódio em alfaces intencionalmente contaminadas com <i>L. monocytogenes</i> e <i>E. coli</i>	22
4.5.1 Preparo das amostras de alface.....	22
4.5.2 Inóculo intencional de <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Escherichia coli</i>	22
4.5.3 Análises microbiológicas.....	24
4.6 Análise Estatística.....	24
5 RESULTADOS.....	25
5.1 Avaliação do processo de higienização de hortaliças realizado na UAN hospitalar utilizando um formulário de inspeção.....	25
5.2 Avaliação da qualidade microbiológica de alfaces recebidas na UAN hospitalar.....	26

5.3 Avaliação microbiológica das soluções cloradas obtidas da higienização realizada pelos manipuladores e equipe do laboratório.....	32
5.4 Análise das características físico-químicas da solução clorada resultante do processo de sanitização de alfaces.....	32
5.5 Efeito da solução clorada de NaDCC em alfaces intencionalmente contaminadas com <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117 e <i>E. coli</i> ATCC 11229.....	32
6 DISCUSSÃO.....	34
7 CONCLUSÕES.....	40
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 Novos hábitos alimentares: o crescimento da alimentação fora do lar

A produção de refeições no ambiente doméstico sofreu grande modificação nas últimas décadas como resultado do crescimento da urbanização e industrialização. Transformações na estrutura demográfica e socioeconômica, crescente profissionalização das mulheres, elevação do nível de vida e de educação, e a redução do tempo disponível da população impulsionaram o crescimento do setor de alimentação fora do lar (Leal, 2010). Esta modificação do padrão alimentar também incluiu o aumento no consumo de alimentos processados, visto que as pessoas buscam maior praticidade, comodidade e rapidez durante as refeições (Monteiro *et al.*, 2011).

Nos dados da Pesquisa Brasileira de Orçamentos Familiares (POF) realizada em 2008-2009 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a participação urbana em alimentação fora do domicílio aumentou em 33,1% (IBGE, 2010). No Brasil, segundo a Associação Brasileira de Refeições Coletivas (ABERC), o mercado de refeições coletivas forneceu no ano de 2018 cerca de 20 milhões de refeições por dia (ABERC, 2018).

Diante da expansão do mercado de serviços de alimentação, houve aumento do número de Unidades de Alimentação e Nutrição (UAN), assim como os *fast-foods*, *self-services*, os serviços de *delivery*, além dos serviços de refeição em bares, padarias e a disposição de alimentos vendidos nas ruas (Martins e Quarentei, 2013).

As Unidades de Alimentação e Nutrição são caracterizadas por espaços que produzem refeições, geralmente em grandes quantidades, para consumo imediato ou não, onde existe normalmente uma relação comercial ou social entre a equipe produtora e os consumidores. Como exemplos importantes em nossa sociedade estão as UAN presentes em escolas públicas, cuja alimentação adequada tem um papel fundamental no processo de aprendizagem dos alunos, assim como uma UAN hospitalar, que representa um importante fator adjuvante ao tratamento médico, uma vez que sua função é melhorar ou recuperar a saúde dos pacientes ao oferecer o aporte necessário de nutrientes na dieta produzida (Abreu, Spinelli e Pinto, 2011).

Frente aos novos hábitos alimentares que colaboram em parte para uma alimentação desequilibrada, o interesse da população por uma alimentação mais saudável assim como pela segurança dos alimentos consumidos vem crescendo nos últimos anos. Essa busca torna-se um grande desafio, pois tais hábitos estão baseados numa cultura de excessos, principalmente

no que se refere ao consumo de lipídios, açúcar e sal em substituição aos cereais integrais, frutas e hortaliças (Beirão-da-Costa *et al.*, 2014).

Conforme as recomendações da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO) e da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization – WHO) é sugerido o consumo mínimo de pelo menos cinco porções diárias de frutas, legumes e verduras, o que equivale a 400g por dia (WHO, 2003). No Brasil, o Guia Alimentar para a População Brasileira enfatiza que a alimentação deve ser baseada em alimentos frescos (frutas, carnes, legumes) (Brasil, 2014).

As hortaliças são recomendadas na dieta alimentar, uma vez que fornecem nutrientes necessários ao funcionamento adequado do organismo, como sais minerais (cálcio e fósforo), fibras alimentares e vitaminas A, C e B3 (Barbosa *et al.*, 2016). Por isso, uma dieta balanceada incluindo o consumo de frutas e hortaliças tende a ser mais vantajosa por disponibilizar um valor maior de nutrientes (Rodrigues, 2012).

Dentro do grupo dos folhosos a alface (*Lactuca sativa*) é considerada o vegetal com maior destaque quanto ao consumo e importância econômica no mundo (Lebeda *et al.*, 2007). Segundo a Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas a alface se destaca por ser a folhosa mais consumida no Brasil com produtividade de aproximadamente 40% do volume total comercializado em empresas fornecedoras de produtos frescos (Sala e Costa, 2012; ABCSEM, 2014).

1.2 Características, propriedades funcionais e nutricionais da alface

A alface é uma hortaliça com ciclo anual, originária de clima temperado que pertence à família Asteraceae (Henz e Suinaga, 2009). O nome *Lactuca* vem do latim *lac* que significa leite (Parsons, 2006). Esta etimologia refere-se ao líquido de aparência leitosa, principalmente da seiva ou látex que emana das hastes dessa planta quando cortada (Lizárraga, Castellón e Mallqui, 2004). A palavra *sativa* se refere ao seu caráter como espécie cultivada.

Esta hortaliça possui uma grande variedade, incluindo: alface-lisa, alface-americana, alface-romana, alface-crespa e alface-roxa, entre outras (Philippi, 2003). As folhas geralmente são grandes, lisas ou crespas, fechando-se ou não na forma de uma cabeça. Sua coloração varia do verde-amarelado até o verde escuro, sendo que alguns cultivares apresentam as margens arroxeadas (Filgueira, 2003).

No mercado nacional, a alface de maior importância econômica é a crespa, tendo preferência de 70%, seguida pela americana (15%), lisa (10%) e romana (5%) (Suinaga *et al.*, 2013). De acordo com dados da Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas a alface se destaca por movimentar anualmente um montante de R\$ 8 bilhões apenas no varejo, com uma produção de mais de 1,5 milhão de toneladas ao ano (ABCSEM, 2013), sendo os maiores produtores os estados de São Paulo (31%), Minas Gerais (27%) e Rio de Janeiro (7%) de acordo com dados do Instituto de Economia Agrícola do governo do estado de São Paulo (IEA, 2014).

A alface é uma importante fonte de vitaminas e sais minerais e destaca-se pelo elevado teor em pró vitamina A, que alcança 4.000 Unidades Internacionais (UI) em 100g de folhas verdes (Caetano *et al.*, 2001). A Tabela 1 apresenta os principais compostos e seus valores na quantidade de 100 g de alface.

Tabela 1 – Composição físico-química da alface

Nutriente	Quantidade em 100 g
Calorias (Kcal) ^a	16
Glicídios (g) ^b	2,3
Proteínas (g)	1,2
Lipídios (g)	0,2
Cálcio (mg) ^c	38
Fósforo (mg)	42
Ferro (mg)	1,1
Vitamina A (mcg) ^d	102
Tiamina (mcg)	110
Riboflavina (mcg)	60
Niacina (mg)	0,2
Vitamina C (mg)	7,6
Umidade (%)	95

Fonte: IBGE, 1996. ^a Kcal: quilocaloria; ^b g: grama; ^c mg: miligrama; ^d mcg: micrograma

Segundo Chadwick *et al.* (2016), a alface apresenta uma ampla diversidade de metabólitos secundários, rica em folato, betacaroteno, por conter vitamina C, potássio e certos fitoquímicos, como os flavonoides e lactucina. Os compostos bioativos, em geral, são reconhecidos pela capacidade de proteção contra doenças crônicas não transmissíveis como aterosclerose, doenças coronárias e algumas neoplasias (Brecht *et al.*, 2010).

Os flavonoides são compostos fenólicos envolvidos em mecanismos de defesa, tolerância a estresse e resistência à perda de água. Atualmente, esses compostos têm despertado muito interesse devido às suas características medicinais (Simkhada *et al.*, 2009; Koirala *et al.*, 2016) e por apresentar grande capacidade antioxidante (Bendini *et al.*, 2006).

Os vegetais de coloração verde apresentam em sua composição diferentes tipos de carotenoides, como β -caroteno, neoxantina, luteína e violaxantina (Andarwulan *et al.*, 2012). O β -caroteno e a luteína são considerados os carotenoides de maior importância nutricional e os principais carotenoides encontrados em alface, que desempenham ação fotoprotetora para o vegetal (Wang *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013).

O ácido ascórbico (vitamina C), juntamente com os carotenoides e os compostos fenólicos atuam na proteção do organismo, devido ao seu potencial antioxidante (Kauer e Kapoor, 2001).

Além dos compostos antioxidantes, os frutooligossacarídeos (FOS) constituem um grupo de oligossacarídeos derivados da sacarose que possuem características prebióticas e estão naturalmente presentes em alfaces (Jovanovic-Malinovska, Kuzmanova e Winkelhausen, 2014; Sancho *et al.*, 2017).

1.3 Principais sistemas de cultivo de alface

A produção de alface é realizada em diferentes sistemas de cultivo, como o convencional, orgânico e hidropônico, os quais apresentam particularidades na produção e que podem influenciar nas características químicas dessas hortaliças (Santana *et al.*, 2006).

O sistema convencional envolve a utilização de fertilizantes químicos, herbicidas e pesticidas, que promovem rápido crescimento e aumento da produtividade. Desta forma, o uso de agrotóxicos e fertilizantes químicos altamente solúveis pode alterar a composição e qualidade dos alimentos, e levar à contaminação ambiental e do consumidor pelo processo de bioacumulação (Stertz, Penteadó e Freitas, 2004).

A agricultura orgânica tem atraído a atenção de todo o setor de produção de alimentos ao reviver princípios eco agrícolas que contemplam a qualidade do solo, da água e do ar e a horticultura, respeitando o meio ambiente e as relações sociais, econômicas e culturais (Bettioli *et al.*, 2004; Gomiero, Pimentel e Paoletti, 2011).

A origem dos fertilizantes orgânicos e os diferentes tratamentos a que são submetidos podem influenciar diretamente na composição microbiana deste material. Os fertilizantes orgânicos utilizados podem ser oriundos do processamento de dejetos humanos e

animais, assim como de resíduos industriais ou urbanos, e podem ser fonte de agentes patogênicos humanos, tais como *Salmonella* sp., *Escherichia coli* e *Campylobacter* sp. (Issa-Zacharia *et al.*, 2010) que podem persistir nos solos por várias semanas a meses. Também *Listeria monocytogenes* pode estar presente nos fertilizantes orgânicos e causar a contaminação dos vegetais em crescimento (Loncarevic, Johannessen e Rorvik, 2005).

O sistema hidropônico é considerado uma tecnologia emergente. Esse método de cultivo proporciona melhor utilização da água e fornecimento de nutrientes, além de contribuir na produtividade das culturas e na redução do uso de pesticidas (García-Valcárcel *et al.*, 2016).

Nos sistemas de cultivo convencional e orgânico existem o contato com solo, matéria orgânica e grande presença de água. Dessa forma, as potenciais fontes de contaminação dos vegetais estão diretamente relacionadas às condições das técnicas de cultivo, à prática do uso de adubo orgânico (esterco animal e vegetal), a utilização de águas contaminadas para irrigação, o transporte feito em engradados abertos e as condições de higiene no manuseio e preparo das refeições, são condições que favorecem a transmissão, principalmente quando o alimento é consumido cru (Souza, Bezerra e Furtado, 2006).

No ano de 2008 a FAO registrou os vegetais folhosos como nível um entre três níveis de prioridade, por apresentarem maior preocupação em riscos microbiológicos, devido ao processo complexo que ocorre do campo até a pré-produção e, que as atividades pós-colheita potencializam a transmissão de microrganismos (FAO, 2008).

Em estudos realizados com amostras de alfaces provenientes de diferentes formas de cultivo (convencional, orgânico e hidropônico) foi mostrado que as alfaces de cultivo hidropônico apresentavam maior segurança na produção em relação às amostras de vegetais convencionais e orgânicos, nas quais eram observadas contagens para coliformes termotolerantes acima do padrão estabelecido (Paiva, 2011; Maffei, Silveira e Catanozi, 2013; Barbosa *et al.* 2016).

1.4 Aspectos relacionados à segurança no consumo de hortaliças

A qualidade do alimento é considerada um requisito de segurança alimentar e nutricional estando relacionado não somente com a produção e garantia de disponibilidade, mas também com a promoção do estado de saúde dos consumidores (Silva *et al.*, 2011). Os alimentos considerados seguros devem estar isentos de todo e qualquer composto ou produto químico que possa provocar danos à saúde do homem (Oliveira e Hoffmann, 2015).

A contaminação dos alimentos é decorrente de falhas na cadeia produtiva e pode ser definida pela presença de contaminantes físicos (fragmentos de vidros, metais e madeiras), químicos (resíduos de antibióticos, micotoxinas, pesticidas e metais pesados) e biológicos (bactérias patogênicas e suas toxinas, vírus, parasitas e protozoários) (Andrade e Pinto, 2008). Os perigos associados à produção de vegetais estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 – Principais fontes de contaminação e os perigos físicos, químicos e biológicos encontrados na cadeia produtiva de vegetais

Produção	Pós-colheita	Processamento
Solo Água de irrigação Adubos orgânicos Vetores	Armazenamento Transporte Manipuladores	Instalações Equipamentos Qualidade da água Manipuladores
Perigos Físicos	Perigos Químicos	Perigos Biológicos
Pedaços de madeira (gravetos, farpas grandes, palitos de dente, outros) Pedaços de vidro Peças de fragmentos de metais (porcas, parafusos, pedaços amorfos, corpos de prova metálicos, outros) Fragmentos de materiais plásticos, perfurantes ou cortantes Pedras	Presença de resíduos de pesticidas Resíduos de agentes sanitizantes Resíduos de venenos para pragas Substâncias tóxicas naturalmente presente nos vegetais Outros químicos (acrilamida, PCB ^a , dioxinas, melanina)	Bactérias patogênicas esporuladas Bactérias patogênicas não esporuladas Norovírus e vírus da Hepatite A Toxinas fúngicas (micotoxinas) Protozoários

Fonte: Embrapa, 2011. ^a PCB: Bifenilpoliclorado

Em especial, as saladas cruas são alimentos que podem apresentar um alto risco de contaminação por microrganismos que causam danos à saúde do consumidor. De acordo com Zandonadi *et al.* (2007) a contaminação microbiológica pode iniciar na produção da matéria-prima e se estender às etapas de transporte, recepção, armazenamento, ocorrendo também na manipulação, por condições precárias de higiene dos manipuladores, equipamentos, utensílios, ambientes e condições inadequadas de armazenamento dos produtos prontos para consumo.

A qualidade higiênico-sanitária das refeições é fundamental para a manutenção da saúde de qualquer consumidor, principalmente, para pacientes hospitalizados. Esta condição é necessária para o restabelecimento da saúde, cuja imunidade pode estar debilitada e por isso são mais suscetíveis a adquirir doenças transmitidas por alimentos (DTA), que pode agravar o quadro clínico, além de aumentar o risco de morte (Stangarlin, 2013).

O Ministério da Saúde em janeiro de 2018 publicou um relatório compreendendo os anos de 2000 a 2017, onde expôs a ocorrência de surtos em decorrência da ingestão de alimentos contaminados (12.503), o total de doentes (236.403 pessoas) e o número de óbitos (182). Dos casos notificados, apenas 3.196 tiveram confirmação laboratorial, as bactérias destacaram-se com 92,2%, onde foram observadas a maior frequência de cepas de *Salmonella* sp., *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e bactérias do grupo coliformes (Brasil, 2018).

Em estudo realizado no município de Sobral-CE por Coutinho *et al.* (2015) foram isoladas 80 cepas da família Enterobacteriaceae, incluindo *Klebsiella pneumoniae* (30%), *E. coli* (8%) e *Enterobacter* sp. (10%) em 12 amostras de alfaces crespas analisadas.

Em 2018, nos Estados Unidos da América (EUA) foi relatado um surto ocorrido em 16 estados e no Distrito de Columbia associado a infecções por *E. coli* O157:H7. O surto atingiu 62 pessoas e identificou a alface romana como fonte de infecção. De 54 pessoas, 25 (46%) foram hospitalizadas, incluindo duas pessoas que desenvolveram síndrome hemolítica urêmica e nenhuma morte foi relatada. A estirpe causadora do surto foi encontrada em sedimentos de um reservatório de água em uma fazenda da Califórnia. *E. coli* O157:H7, que foi isolada de pessoas doentes neste surto estava relacionada geneticamente à cepa de *E. coli* isolada de pessoas doentes em um surto de 2017 envolvendo a contaminação de verduras nos Estados Unidos e no Canadá (CDC, 2018).

Em 1990, em um estudo no hospital universitário do Rio de Janeiro avaliou a presença de *Pseudomonas aeruginosa* em vegetais como fonte de infecção em pacientes hospitalizados. Esta bactéria estava presente em todas as variedades de vegetais (27%) e as maiores contagens foram observadas em amostras de alfaces (Correa, Tibana e Gontijo, 1991). Em outro estudo epidemiológico realizado em um hospital da cidade do Rio de Janeiro, realizado por Martins *et al.* (2010) apontaram a UAN hospitalar como possível fonte de contaminação do surto de DTA causada por *L. monocytogenes* em pacientes hospitalizados e, cinco casos foram fatais. Este fato mostra a importância de maior controle higiênico-sanitário durante o preparo dos alimentos.

Considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, além da necessidade de elaborar requisitos higiênico-sanitários para serviços de alimentação, o Ministério da Saúde por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) instituiu a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n.º 216/2004, que orienta os serviços de alimentação quanto às exigências mínimas que devem cumprir (Brasil, 2004). Ainda neste sentido, a RDC n.º 12/2001 estipula os padrões microbiológicos para alimentos, a qual estabelece o limite de contagem de 10^2 Número Mais

Provável por grama (NMP/g) para coliformes termotolerantes e ausência de *Salmonella* sp. em alimentos definidos como “Hortaliças, legumes e similares, incluindo cogumelos (fungos comestíveis) frescas, *in natura*, preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas) sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto, com exceção de cogumelos” (Brasil, 2001).

A legislação vigente que regulamenta os padrões microbiológicos para alimentos preconiza a ausência de *Salmonella* sp. em amostras de vegetais, sem mencionar *L. monocytogenes* como critério. Contudo, surtos causados por *L. monocytogenes* associados ao consumo de hortaliças já foram reportados, sendo esta espécie considerada como um perigo microbiológico em vegetais folhosos (FAO, 2008).

Listeria monocytogenes é amplamente distribuída na natureza e apresenta habilidade de sobreviver por longos períodos de tempo no ambiente, colonizando vegetais, solo, águas superficiais e alimentos (Hitchins e Jinneman, 2011). Este patógeno tem como um dos principais diferenciais e fator que aumenta o risco dos surtos, a capacidade de se multiplicar em temperaturas baixas, resistir a condições adversas, como ambientes com baixo pH, altas concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e baixa tensão de oxigênio (Swaminaphan *et al.*, 2007). Trata-se de um bacilo Gram positivo curto, móvel que causa infecções severas, com quadros de aborto, meningite e septicemia, acometendo principalmente gestantes, crianças, idosos e adultos com o sistema imunológico comprometido, que formam o grupo de risco para listeriose.

A listeriose representa um problema de saúde pública devido à gravidade da infecção e a alta taxa de mortalidade, entre 20 a 30% (Newell *et al.*, 2010). Devido à sua capacidade de se multiplicar sob temperatura de refrigeração, alimentos prontos para o consumo e estocados por longos períodos, como frios, bem como aqueles consumidos crus como as hortaliças e vegetais minimamente processados, são veículos comuns de infecção por este patógeno.

Outro microrganismo comumente associado à contaminação de alimentos é *E. coli*. Pertencente ao grupo dos coliformes termotolerantes e considerado indicador de contaminação fecal, sua presença ajuda na avaliação da condição de higiene da produção, sugerindo uma possível presença de outros patógenos no produto (Fernandes, Andreatta e Oliveira, 2006). Esta espécie é considerada integrante da microbiota entérica de mamíferos e aves. Entretanto, após o reconhecimento de diversas patologias entéricas e extraintestinais causadas por sorotipos de *E. coli*, este microrganismo também passou a ser apontado como um dos agentes bacterianos mais frequentes em DTA (Macedo *et al.*, 2018).

Ainda que exista um potencial risco no consumo de hortaliças cruas como a alface, este fator está associado principalmente a falhas nas etapas de produção e preparo. O consumo associado à saúde é amplamente estimulado em UAN, assim como no próprio ambiente doméstico. Entretanto, cuidados nestes ambientes devem ser tomados, principalmente em UAN pelo grande número de refeições preparadas, em que abrange atividades de manipulação, armazenamento e/ou exposição de alimentos.

Assim, deve-se reconhecer que, para a ingestão segura principalmente de alimentos crus, como os vegetais, é necessária a sanitização adequada de hortaliças. A etapa de sanitização, que pela falta de capacitação dos manipuladores pode ser negligenciada ou executada incorretamente (Pinheiro *et al.*, 2011). Visto que as frutas e hortaliças representam cerca de 56% do volume de produção diária de um cardápio (Strasburg, 2016).

1.5 Higienização de hortaliças em UAN

Segundo a RDC n.º 216/2004, a higienização é uma operação compreendida em duas etapas: a limpeza e a desinfecção. A limpeza é a etapa de remoção de substâncias minerais ou inorgânicas indesejáveis enquanto a sanitização consiste na redução do número de microrganismos em nível que não comprometa a qualidade higiênico-sanitária do alimento (Brasil, 2004; Gil *et al.*, 2009). O processo de higienização de hortaliças e frutas está descrita no Quadro 2.

Quadro 2 – Etapas do processo de higienização de hortaliças e frutas

Etapas	Operação do processo	Referências
1 ^a	Selecionar, retirar as folhas ou unidades deterioradas	RDC ^a n.º. 216/2004 Portaria CVS ^b 5/2013 Portaria 2619/2011 ABNT ^c , 2016
2 ^a	Lavar em água corrente as hortaliças folhosas, folha a folha ou frutas e legumes, um a um	RDC n.º. 216/2004 Portaria CVS 5/2013 Portaria 2619/2011 ABNT, 2016
3 ^a	Imergir as hortaliças e frutas na solução sanitizante a base de cloro entre 100 e 250 ppm a partir do tempo recomendado pelo fabricante A solução clorada pode ser reutilizada quando o monitoramento indicar os limites de 100 e 250 ppm de cloro livre	RDC n.º. 216/2004 Portaria 2619/2011 Portaria CVS 5/2013 ABNT NBR ^d 15635:2015 ABNT, 2016

4 ^a	Enxaguar em água corrente	RDC n°. 216/2004 Portaria CVS 5/2013 ABNT NBR 15635:2015 ABNT, 2016
5 ^a	Manter os alimentos sob refrigeração até a hora de servir	RDC n°. 216/2004 Portaria 2619/2011 Portaria CVS 5/2013

Fonte: Brasil, 2004; São Paulo, 2011; Brasil 2013; ABNT, 2015; ABNT, 2016. ^aRDC: Resolução da Diretoria Colegiada ^bCVS: Centro de Vigilância Sanitária; ^cABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas; ^dNBR: Norma Brasileira;

Estudos realizados em restaurantes concluíram que a maioria das irregularidades constatadas estava relacionada a práticas inadequadas de manipulação de alimentos (consequentes à falta de treinamento e capacitação de manipuladores sobre Boas Práticas de manipulação); à falta de qualificação dos fornecedores, à falta de controle de temperatura dos alimentos; à inadequação das instalações; ao acúmulo de objetos em desuso; à falta de higienização conforme preconizado pela legislação e a falhas nos cuidados de higiene pessoal (Vergara e Albuquerque, 2010; Oliveira, Santana e Silva, 2011). Conforme Oliveira, Brasil e Taddei (2008) mais de 60% dos casos de doenças de origem alimentar decorrem do descuido higiênico-sanitário de manipuladores, das técnicas inadequadas de processamento dos alimentos, da deficiência de higiene da estrutura física, dos utensílios e dos equipamentos.

A legislação sanitária brasileira exige que as UAN implementem os Procedimentos Operacionais Padrão (POP), que estabelecem instruções sequenciais para a realização das operações rotineiras e específicas na manipulação de alimentos, com a finalidade de garantir a segurança dos alimentos (Brasil, 2004).

Em complementação à legislação, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), por meio da Norma Brasileira (NBR) 15635:2015 especificou os requisitos de Boas Práticas e o Controle Operacional Essencial (COE), que auxiliam na elaboração da documentação de monitoramento, listas de verificação e registro das etapas de produção de refeições (ABNT, 2015).

Para utilização em UAN hospitalar, os sanitizantes devem estar de acordo com o recomendado pela RDC n°. 14 de 28 de fevereiro de 2007 que aprova o Regulamento Técnico para Produtos com Ação Antimicrobiana, harmonizado no âmbito do Mercado Comum do Sul (MERCOSUL) (Brasil, 2007). Para a formulação do produto, apenas são permitidas, como princípios ativo de produtos com ação antimicrobiana, substâncias comprovadamente aceitas pela EPA (*Environmental Protection Agency*), FDA (*Food and Drug Administration*) ou Comunidade Europeia.

A operação de lavagem associada ao uso de soluções sanitizantes é considerada a única etapa na qual pode ser alcançada a redução no número de microrganismos deterioradores e patogênicos (Prado-Silva *et al.*, 2015). Mesmo com o uso de subprodutos clorados o enxágue e desfolhagem das partes mais externas de vegetais devem ser feitas para minimizar a contaminação (FAO, 2008).

A qualidade da higienização das hortaliças depende da atividade do sanitizante e de fatores tais como concentração, solubilidade, quantidade de microrganismos presentes na matéria prima, assim como a disponibilidade e treinamento de manipuladores (Oliveira, 2005).

As soluções sanitizantes mais utilizadas são aquelas à base de cloro (Pereira *et al.*, 2011). A facilidade do uso, o baixo custo, a alta atividade antimicrobiana e completa dissolução em água, fazem com que os agentes clorados sejam frequentemente utilizados como desinfetantes em estabelecimentos produtores de alimentos (Andrade e Pinto, 2008).

O cloro foi descoberto por Humprey Davy em 1808. Mais tarde, em 1881, Koch evidenciou sua atividade bactericida, sendo logo depois aprovado pela Associação Americana de Saúde Pública (*American Public Health Association* – APHA) para ser utilizado como desinfetante, principalmente no tratamento de água em todo o mundo (APHA, 1999).

A ação oxidante e sanitizante dos derivados clorados de origem inorgânica, por exemplo, gás cloro, hipoclorito de sódio (NaClO) e hipoclorito de cálcio (CaClO_2) é controlada pelo ácido hipocloroso (HClO), produto resultante da hidrólise da substância clorada, é a forma de cloro livre disponível com amplo espectro de ação contra diferentes microrganismos. A ação do ácido hipocloroso é dependente de pH, a concentração aumenta com decréscimo do valor de pH (São José, 2010). Segundo Cenci *et al.* (2006) para que haja uma melhor eficácia na etapa de sanitização o pH da solução de lavagem deve estar entre 6,5 a 7,0, pois é a faixa em que o cloro tem maior ação bactericida.

O dicloroisocianurato de sódio - $\text{C}_3\text{Cl}_2\text{N}_3\text{NaO}_3$ (NaDCC) e o ácido tricloroisocianúrico ($\text{C}_3\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}_3$) são compostos clorados orgânicos, comercializados na forma de pó e possuem maior estabilidade ao armazenamento do que os compostos clorados de origem inorgânica. Estes são elementos estáveis em solução aquosa, o que implica em uma liberação mais lenta do ácido hipocloroso e, conseqüentemente, permanecem efetivos por períodos maiores de tempo, mesmo na presença da matéria orgânica (Macedo, 2004). O dicloroisocianurato de sódio apresenta vantagem em relação ao hipoclorito de sódio por liberar o ácido hipocloroso em ambiente onde o pH é alto e variado (Clasen e Edmondson, 2006).

O cloro, quando em solução aquosa dissocia-se em ácido hipocloroso e íons de hipoclorito. Isto afeta os microrganismos por meio da permeabilidade da membrana citoplasmática. Como resultado ocorre uma alteração da respiração celular e inibição do metabolismo dos carboidratos (Inatsu *et al.*, 2010; Athayde *et al.*, 2018).

Os compostos clorados são amplamente utilizados para a sanitização de hortaliças. Contudo, além de estudos que associam a formação de subprodutos químicos mutagênicos, tóxicos e carcinogênicos em água, em alimentos ou em superfícies de contato (Nascimento *et al.*, 2005; Silveira *et al.*, 2008).

Dentre os principais fatores que podem interferir na eficácia da solução clorada estão o tipo e apresentação do vegetal (inteiro ou cortado), tipo de sanitizante e concentração, tempo de contato e temperatura, pH e quantidade de matéria orgânica dispersa na solução, bem como as características da água utilizada no processo (Prado-Silva *et al.*, 2015).

A atividade antimicrobiana do cloro pode ter sua eficácia reduzida em função do decréscimo do cloro livre ao longo do tempo de contato, devido às reações do agente sanitizante com constituintes da água, materiais orgânicos e inorgânicos (Prado-Silva *et al.*, 2015). Estas reações reduzem a quantidade de cloro livre disponível na água, oportunizando a sobrevivência de patógeno na água do tratamento e permanência na hortaliça (Suslow, 1997; Nou e Luo, 2010).

Apesar destes fatores, a reutilização da solução clorada é descrita nos documentos de Boas Práticas Higiênico Sanitária para Serviços de Alimentação da ABNT, no Manual ABERC de Práticas de Elaboração e Serviço de Refeições para Coletividades e na cartilha sobre Boas Práticas para Serviços de Alimentação, baseado na RDC n.º 216/2004 e seja recomendada por alguns fabricantes de sanitizantes para higienização de hortaliças (Brasil, 2004; ABERC, 2015; ABNT, 2016). Dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (Centers for Diseases Control and Prevention – CDC) mostram a eficácia do cloro contra bactérias causadoras de doenças, em uma concentração de 0,5 mg/L de cloro foi possível a inativação de 99,99% de estirpes de *Escherichia coli* num intervalo de cinco minutos (CDC, 2012).

Porém, alguns estudos têm evidenciado a presença de microrganismos patogênicos que apresentaram certo grau de resistência à ação do cloro, como *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhi, *Cryptosporidium parvum* e *Listeria monocytogenes* (Parish *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). Um dos fatores a ser considerado como determinante no processo de higienização de hortaliças com cloro é a falha no treinamento dos manipuladores, o que tem sido evidenciado em diferentes estudos.

Uma ferramenta que vem sendo frequentemente utilizada para avaliar a adoção e manutenção de práticas adequadas em serviços de alimentação são os roteiros de inspeção, também conhecidos como lista de inspeção ou *check list*. Estes são utilizados para a verificação, avaliação e monitoramento de serviços de alimentação com relação à legislação vigente, permitindo identificar e assinalar os itens que estão ou não em conformidade com a legislação sanitária (Veiros *et al.*, 2007).

Os roteiros são de fácil aplicação e conseguem evidenciar com baixo, uma análise detalhada do processo produtivo de refeições e dos procedimentos higiênico-sanitários adotados (Veiros *et al.*, 2009). Ainda que a UAN possa desenvolver e validar seu próprio roteiro, já existem diversos roteiros na literatura que foram validados em UAN, como os sugeridos pelo Centro de Vigilância Sanitária (CVS) 5/2013 (Brasil, 2013) e RDC nº. 275/2002 da ANVISA (Brasil, 2002), bem como por alguns autores como Akutsu *et al.* (2005), Tomich *et al.* (2005), Tancredi, Silva e Marin (2006), Saccol *et al.* (2009).

A permanência de microrganismos patogênicos em hortaliças após a sanitização deve ser investigada, uma vez que a higienização é o único tratamento que pode diminuir a carga microbiana em vegetais. Usualmente consumida crua, a alface percorre alguns processos que podem afetar a sua segurança microbiológica durante o transporte, armazenamento, manipulação e comercialização. Em UAN, a carga microbiana da alface pode não ser reduzida na etapa de higienização quando o processo não for realizado adequadamente. Os procedimentos de controle de qualidade, assim como o treinamento de manipuladores em UAN visam assegurar as condições higiênico-sanitárias dos vegetais.

2 JUSTIFICATIVA

O consumo de refeições fora do lar potencializa a ocorrência de DTA, uma vez que nas UAN as refeições são produzidas em larga escala e torna-se mais difícil o controle efetivo de todas as preparações.

A alimentação hospitalar como parte dos cuidados oferecidos aos pacientes deve integrar qualidades e funções para recuperação da saúde. Tanto o valor dietético e nutricional quanto os aspectos de segurança microbiológica dos alimentos são questões fundamentais para a qualidade dos serviços prestados em Unidades de Alimentação e Nutrição Hospitalar. A inclusão de hortaliças no cardápio proporciona refeições nutricionalmente balanceadas.

Levando-se em consideração a importância do consumo de hortaliças, e que estes alimentos são normalmente consumidos crus, torna-se necessário que sejam submetidos ao processo de higienização de forma adequada e segura, uma vez que falhas neste processo são consideradas potencial fonte de contaminação.

A utilização de compostos antimicrobianos para uso na higienização de alimentos representa uma ferramenta alternativa no combate a patógenos alimentares. Entretanto é fundamental entender as limitações de sua utilização.

Da mesma forma, a volumosa rotina de trabalho pode impor falhas no processo que podem passar despercebidas pela equipe de produção, sendo necessário comparar estes procedimentos realizados na rotina de trabalho com o processo realizado em condições ideais e controladas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliação do processo de higienização de alface crespa em uma UAN Hospitalar e a eficácia do reuso da solução clorada na viabilidade de patógenos alimentares

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar adequação do processo de higienização de hortaliças realizado na UAN hospitalar utilizando um formulário de inspeção;
- Avaliar a qualidade microbiológica de alfaces recebidas de fornecedor da UAN hospitalar;
- Comparar a eficácia do processo de higienização de alface realizado na rotina de trabalho da UAN e o processo realizado em condições laboratoriais;
- Investigar o efeito da solução de dicloroisocianurato de sódio em alfaces intencionalmente contaminadas com *L. monocytogenes* e *E. coli*;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do estudo

O estudo foi realizado na UAN hospitalar do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG) da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O IPPMG possui 68 leitos e fornece seis tipos de refeições diárias (desjejum, colação, almoço, lanche, jantar e ceia) aos pacientes internados e possui restaurante para atender os acompanhantes de pacientes, residentes e funcionários.

Trata-se de um estudo de natureza quantitativa, descritiva experimental, tendo como alvo o processo de higienização das hortaliças no período de fevereiro a julho de 2018, que ocorreu em duas etapas: a primeira etapa contemplou a verificação do processo de higienização de hortaliças. A segunda etapa foi experimental e consistiu na avaliação da eficácia do processo de higienização de hortaliças na UAN e no laboratório, além da eficácia da solução clorada utilizada no processo de higienização de alface utilizando análises microbiológicas e físico-químicas. Foi escolhida a alface crespa para a avaliação da eficácia do uso da solução clorada no processo de higienização devido à frequência diária no cardápio da unidade.

4.2 Verificação do processo de higienização de hortaliças realizado na UAN hospitalar utilizando um formulário de inspeção

O processo de higienização das hortaliças (PHH) foi avaliado detalhadamente no setor da dietética, por meio de formulário elaborado para esta pesquisa, "Formulário de Avaliação do Processo de Higienização de Hortaliças" (FAPHH) (Quadro 3). Foi baseado na norma brasileira NBR 15635:2015 (ABNT, 2015) e RDC n.º 216/2004 (Brasil, 2004). O instrumento é composto de 10 itens de avaliação com a finalidade de verificar a realização das quatro etapas do PHH, além da concentração do sanitizante, a imersão das hortaliças na solução clorada, o controle de tempo de sanitização, a contaminação cruzada e a reutilização da solução clorada.

O formulário foi aplicado na UAN hospitalar por meio de observação direta durante a produção das refeições e preenchido no período de 10 dias.

Quadro 3 - Formulário de Avaliação do Processo de Higienização de Hortaliças

Processo de Higienização de Hortaliças e Frutas		C ^a	NC ^b	NA ^c	NO ^d
1	E realizada 1 ^a etapa: seleção e retirada das partes estragadas				
2	É realizada 2 ^a etapa: lavagem de uma a uma folha ou unidade a unidade				
3	É realizada 3 ^a etapa: sanitização com solução clorada				
4	É realizada 4 ^a etapa: enxágue em água corrente				
5	É controlado o tempo em que as hortaliças permanecem na solução sanitizante				
6	A solução sanitizante não é reutilizada				
7	O preparo da solução desinfetante é realizado por meio de medidores graduados				
8	Há planilha de controle da higienização dos alimentos que serão consumidos crus				
9	O processo é realizado de forma que não ocorra a contaminação cruzada				
10	Durante a sanitização das hortaliças permanecem totalmente imersas na solução clorada				
	Total de itens =				
	Total de itens em conformidade =				
	Percentual (%) de itens em conformidade =				

^aC- conforme; ^bNC – não conforme, ^c NA – não se aplica, ^dNO – não observado

4.3 Origem das amostras de alface e preparo da solução clorada

Foram utilizadas alfaces do tipo crespa (*Lactuca sativa var. crispa*). Os pés de alface foram obtidos diretamente dos lotes semanais recebidos de fornecedores da Central Estadual de Abastecimento do Estado do Rio de Janeiro (CEASA – RJ) e estocados sob refrigeração por 18-24h.

A solução clorada foi preparada em uma caixa de polietileno higienizada, em que era homogeneizada com uma espátula de forma a se obter uma concentração final de 200 mg/L de dicloroisocianurato de sódio (NaDCC) (p/v).

A concentração de cloro foi medida com um fotômetro multiparâmetro modelo Micro7+ (Akso, Brasil) com auxílio de fitas teste cloro (Akso, Brasil), segundo as recomendações do fabricante.

4.4 Definição das unidades amostrais e avaliação da higienização

O estudo foi realizado com 10 unidades amostrais de diferentes lotes. Cada unidade amostral era composta por aproximadamente oito pés de alface obtidos em uma entrega do fornecedor da UAN hospitalar. A partir destes, as folhas externas e as danificadas eram desprezadas, e as folhas selecionadas eram coletadas assepticamente e depositadas em caixas plásticas previamente higienizadas. Desta unidade amostral, 25 g de alface foram coletadas aleatoriamente para a determinação das características microbiológicas do lote antes do processo de higienização, sendo denominada amostra de alfaces recebidas na UAN (AR).

Uma alíquota de 1 Kg de folhas foi processada na rotina de trabalho da UAN hospitalar, sendo realizada pelos manipuladores da unidade e foi considerada a amostra de alfaces higienizadas na UAN (AH1). As amostras foram lavadas uma a uma com água corrente. Em seguida foram imersas por 10 minutos em 7 litros de solução contendo 200 mg/L de dicloroisocianurato de sódio (Noordhen Brasil, Brasil), preparada e utilizada segundo as recomendações do fabricante. Ao final do processo as folhas foram enxaguadas em água corrente (Figura 1).

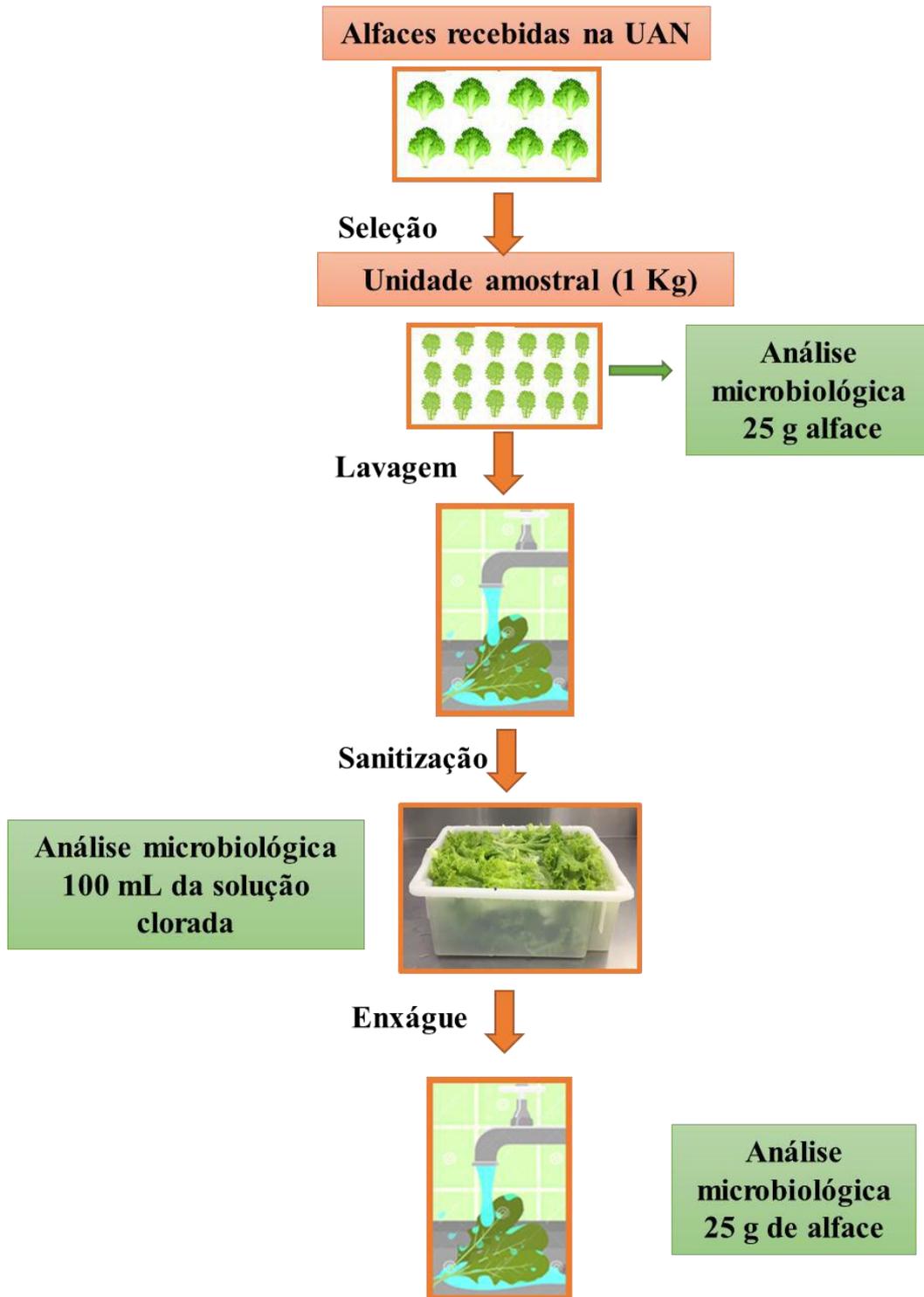


Figura 1 – Processo de higienização de alface realizado na UAN e o processo realizado no laboratório

Outra alíquota de folhas foi processada no laboratório, sendo considerada como processada em condições ideais de trabalho. Esta foi denominada amostra de alfaces higienizadas no laboratório (AH2). Para tal, foram tratados 50 g de folhas em 1 litro da solução dicloroisocianurato de sódio 200 mg/L por 10 minutos. Ao final do processo as folhas também foram enxaguadas em água corrente.

Todas as amostras foram transportadas assepticamente para o laboratório de microbiologia e analisadas no mesmo dia da coleta. O tempo aproximado do transporte foi de 15 minutos.

4.4.1 Análises microbiológicas das amostras das alfaces e da solução clorada

A análise das alfaces recebidas na UAN e higienizadas foi realizada segundo a metodologia proposta pelo *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (APHA, 2001). Para tal, 25 g das folhas das alfaces recebidas na UAN ou das alfaces higienizadas foram transferidas para sacos plásticos estéreis e homogeneizados com 225 mL de água peptonada estéril 1% (p/v) em homogeneizador mecânico tipo *stomacher* (Logen Scientific, Reino Unido) por um minuto. Após a homogeneização das alíquotas foram realizadas diluições decimais seriadas que foram inoculadas em meios de cultura para as análises microbiológicas.

As análises microbiológicas da solução clorada foram realizadas de acordo com as metodologias descritas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1999). Para inativação do cloro livre nas amostras de solução clorada e das alfaces higienizadas, foi utilizada uma solução de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) à 10% (v/v). A inativação do cloro livre foi monitorada por fotômetro multiparâmetro Micro7+ (Akso, Brasil) com auxílio de fitas teste cloro (Akso, Brasil).

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas de alfaces foram comparados aos padrões estabelecidos pela RDC n.º 12/2001 (Brasil, 2001).

4.4.1.1 Contagem de bactérias aeróbias mesófilas totais

Alíquotas de 100 μL e 10 μL das diluições foram inoculadas na superfície de placas contendo ágar padrão para contagem e espalhado uniformemente com alça de Drigalsky. Para

a solução clorada foi aplicado inóculo de 100 µl e 10 µl a partir de 100 mL da amostra. As placas foram incubadas à 37 °C por 24 a 48 horas.

Foi utilizado o método de semeadura por profundidade nas amostras das alfaces higienizadas e nas amostras de solução clorada, 1 mL das amostras foram inoculadas em placas de Petri estéreis e cobertas com 20 mL de ágar padrão para contagem (Himedia, Índia). As placas foram incubadas à 37 °C por 24 a 48 horas.

A pesquisa deste grupo de microrganismos também foi realizada pela técnica de membrana filtrante para as amostras de solução clorada. Para tal, 100 mL da amostra foram filtrados através de um sistema de filtração (Fabbe-Primar, Brasil) com membrana filtrante de nitrato de celulose 0,45 µm (Microclar, Argentina). Após a filtração, a membrana foi assepticamente depositada sobre uma placa contendo ágar padrão para contagem e incubadas à 37 °C por 24 a 48 horas. Os resultados obtidos foram apresentados em UFC/g.

4.4.1.2 Determinação do Número Mais Provável de coliformes totais e termotolerantes

Para esta técnica foram utilizadas séries de 3 tubos contendo caldo lactose bile verde brilhante 2% (Himedia, Índia) e tubos de Durhan invertidos no interior, para inóculo de diferentes volumes. Para solução clorada, os inóculos foram de 10 mL, 1 mL e 0,1 mL, para as alfaces higienizadas 1 mL, 0,1 mL e 0,01 mL e alfaces recebidas na UAN 1 mL, 0,1 mL, 0,01 mL e 0,001 mL. Os tubos foram incubados à 37 °C durante 24 a 48 horas. O resultado positivo foi considerado pela presença de turvação do meio e formação de gás.

A determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes foi realizada a partir dos tubos positivos de coliformes totais para tubos contendo 5 mL de caldo EC (Himedia, Índia). Os tubos foram incubados em banho-maria a $44,5 \pm 0,5$ °C por 24 horas.

Como controle foi utilizado a estirpe de *E. coli* – *American Type Culture Collection* (ATCC) 11229 e como controle negativo *Enterococcus faecalis* ATCC 10100. O número mais provável (NMP) foi determinado por meio da tabela de Hoskins (APHA, 1999). Os resultados foram apresentados em NMP/g ou NMP/mL.

4.4.1.3 Pesquisa enzimática de coliformes totais e termotolerantes

O método é baseado em substratos enzimáticos cromogênicos (origina uma mudança de cor) ou fluorogênicos (conduz à emissão de fluorescência) para identificar enzimas específicas dos coliformes totais (β -galactosidase) e *E. coli* (β -glucuronidase). Nas soluções

cloradas, as concentrações de coliformes foram pesquisadas por cultura de enriquecimento em caldo Colilert® (IDEXX Laboratories, EUA). Foram utilizados 100 mL da solução clorada e tratados com 1 mL de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) a 10% (v/v) para neutralizar o cloro. Após isso, foi adicionado um flaconete de Colilert e incubados à 37 °C por 24 a 48 horas. A formação de coloração amarela foi considerada positiva para a presença de coliformes totais e a observação de fluorescência sob a luz ultravioleta para *E. coli*.

4.5 Investigação do efeito da solução clorada de dicloroisocianurato de sódio em alfaces intencionalmente contaminadas com *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*

4.5.1 Preparo das amostras de alface

Foram adquiridos dois pés de alface, as folhas externas e deterioradas foram desprezadas. Em seguida, foram selecionadas 200 g de alfaces para higienização com solução contendo 200 mg/L de dicloroisocianurato de sódio. Destes 10 gramas foram analisadas microbiologicamente para verificar a eficiência do processo.

4.5.2 Inóculo intencional de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*

Foram utilizadas as estirpes de *L. monocytogenes* ATCC 19117 e *E. coli* ATCC 11229. As estirpes congeladas foram ativadas em caldo BHI (*brain heart infusion* -infusão cérebro e coração) por 24h à 37 °C. A partir deste cultivo as estirpes foram inoculadas na superfície de ágar BHI e incubadas nas mesmas condições. Das colônias isoladas foram preparadas suspensões em solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v) e inoculadas para atingir a densidade de células de aproximadamente 10^8 UFC/L. O controle foi realizado por diluição e plaqueamento da em ágar BHI e incubados à 37 °C por 24 horas. Foi preparado um lote de estudo das folhas intencionalmente contaminadas com *L. monocytogenes* e *E. coli*, separadamente.

A quantidade de 190 g de folhas de alface foi imersa em 1 litro da suspensão bacteriana. As folhas foram mantidas por 30 minutos e ao final escorridas e analisadas microbiologicamente para cada um dos microrganismos. As alfaces foram separadas em dois lotes de 80 g. Um lote foi submetido ao processo de higienização por 10 minutos com 200 mg/L de dicloroisocianurato de sódio e enxaguado em água estéril. Em seguida, a mesma

solução clorada (solução de réuso) foi utilizada para a higienização do segundo lote (Figura 2).

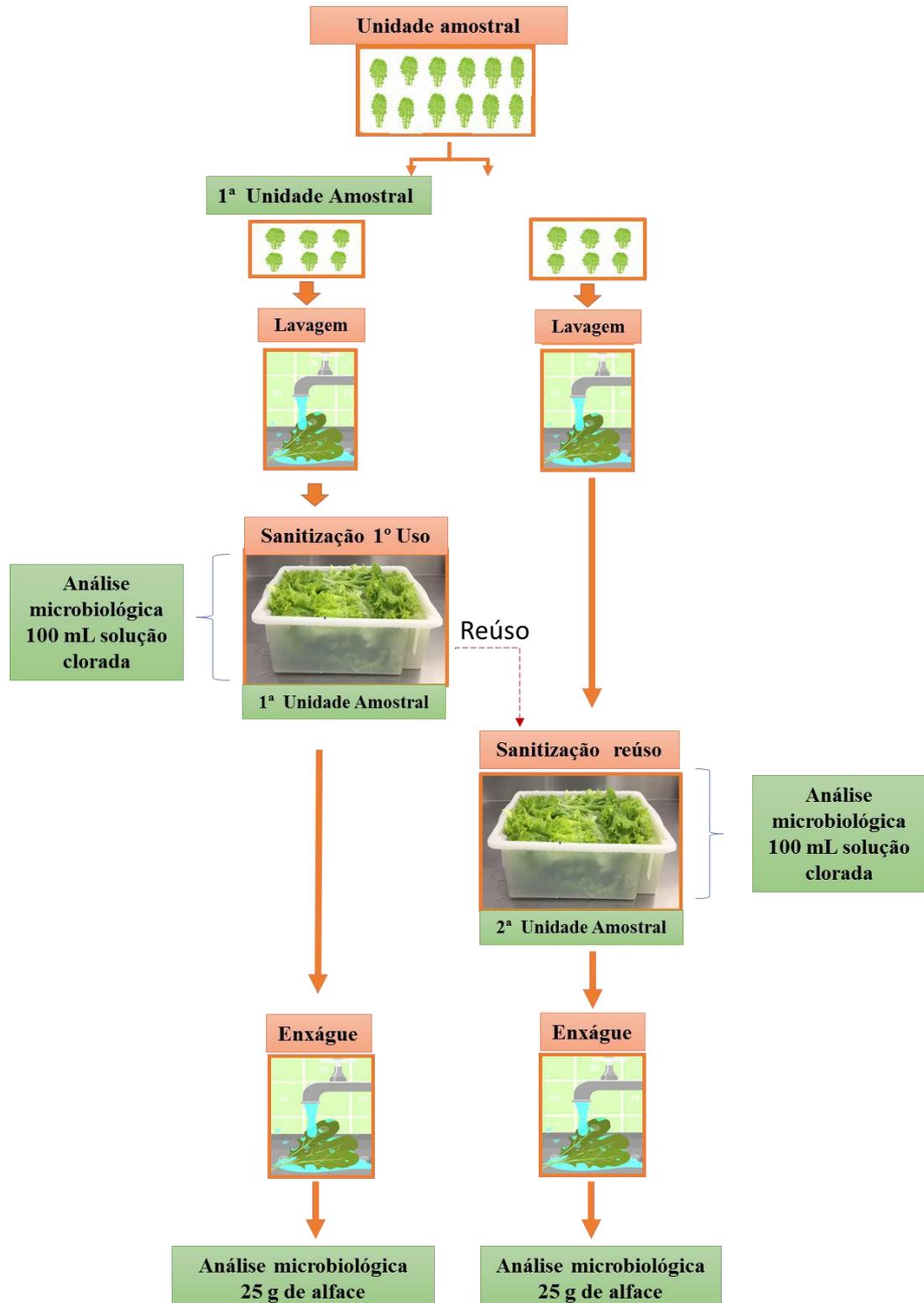


Figura 2 – Avaliação da eficácia da solução clorada de primeiro uso e da solução clorada de réuso em alfaces intencionalmente contaminadas com *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Escherichia coli* ATCC 11229

4.5.3 Análises microbiológicas

Com objetivo de avaliar a contagem de bactérias nos lotes de alfaces higienizadas, 25 g de folhas foram submetidas à análise microbiológica para a determinação da contagem de *L. monocytogenes* e *E. coli*. A amostra de 25 g das folhas higienizadas foi transferida para sacos plásticos estéreis e homogeneizadas com 225 mL de água peptonada estéril 1% (p/v). Após a homogeneização da alíquota foi aplicado inóculo de 100 µL e 10 µL de uma diluição decimal nas superfícies dos meios contendo ágar ChromID coli (Biomérieux, França) e ágar PALCAM (Himedia, Índia). As placas foram incubadas à 37 °C por 24 a 48 horas. Os resultados obtidos foram expressos em UFC/g.

O ágar ChromID coli é um meio de cultura diferenciado que contém dois substratos cromogênicos específicos que são clivados por enzimas produzidas por *E. coli* e coliformes (β -glucuronidase e β -glucosidase).

O ágar PALCAM é um meio seletivo devido à presença de cloreto de lítio, ceftizidima, polimixinas B e cloridrato de acriflavina. Utilizado no isolamento e enumeração de *Listeria* sp. O cloreto de lítio mantém o equilíbrio osmótico do meio, a concentração de ceftizidima é reduzida para reforçar o crescimento de *Listeria* sp. A diferenciação do meio é baseada na hidrólise da esculina (escurecimento do meio) e na fermentação de manitol.

4.6 Análise Estatística

Para avaliar a hipótese nula de que houve diferença na contagem microbiológica entre alfaces higienizadas na UAN e alfaces higienizadas no laboratório foram utilizadas análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey. Foi considerado nível de significância de 5% e o valor p-valor apresentado foi referente ao teste post hoc Tukey.

Para verificar se houve diferença estatisticamente significativa na concentração de cloro para as amostras antes e após a higienização foi utilizado o teste Mann Whitney. A análise foi feita pelo programa Pacote Estatístico para as Ciências Sociais (Statistical Package for the Social Sciences - SPSS) desenvolvido por Máquinas de Negócios Internacionais (International Business Machines – IBM) para *Windows* versão 21.0 sendo considerado o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do processo de higienização de hortaliças realizado na UAN hospitalar utilizando um formulário de inspeção

O Formulário de Avaliação do Processo de Higienização de Hortaliças (FAPHH) foi aplicado na UAN hospitalar em fevereiro de 2018 durante 10 dias. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Percentual de adequação do processo de higienização de hortaliças na UAN hospitalar durante 10 dias

Item Observado	Número de dias em que a ação foi realizada	%
Cumprimento das quatro etapas de higienização	8	80
Controle de tempo	10	100
A solução clorada não era reutilizada	10	100
Medidores no preparo da solução clorada	0	0
Planilha de controle de higienização	0	0
Risco de contaminação cruzada	4	40
Imersão completa das hortaliças na solução clorada	0	0

Foi observado que em dois dias pelo menos uma das seguintes etapas de higienização: seleção das folhas, lavagem ou enxague, não foi executada devido ao desfalque na equipe de manipuladores e sobrecarga na rotina de trabalho. O tempo mínimo indicado para higienização foi respeitado em todos os tratamentos, porém em dois dias os manipuladores extrapolaram o tempo de contato em 30 minutos.

Em função do baixo volume de hortaliças a ser processada no setor, a solução clorada não era reutilizada e não foi observada a utilização de medidores graduados para o preparo da solução. A caixa utilizada para sanitização também não apresentava indicação de graduação para auxílio na dosagem. O produto sanitizante era disponibilizado em copo plástico sem indicação de graduação, e no quarto dia de avaliação houve a troca do produto para hipoclorito de sódio a 1%, devido à falta de NaDCC no estoque da UAN. Nos demais dias o NaDCC foi disponibilizado novamente.

O setor da dietética apresentava duas Instruções de Trabalho (IT), uma nomeada “Higienização de Hortifrutícolas”, não foi observada a descrição da etapa de seleção do produto sanitizante e do modo de preparo da solução clorada. Na outra IT intitulada “Legumes, frutas e verduras” foi observada as descrições das quatro etapas do processo de higienização de hortaliças e frutas, o produto sanitizante, o preparo da solução clorada e

informação sobre quais os alimentos deveriam ser submetidos à sanitização. Porém, não foi observada a consulta desses materiais no período da avaliação pelos manipuladores de alimentos. Apesar das orientações no setor de Nutrição e Dietética sobre quais hortaliças que deveriam ser submetidas ao processo de higienização, alguns alimentos consumidos crus (beterraba, cenoura, maçã e pera) não foram sanitizados. Da mesma forma que, não foi evidenciada planilha de registro da higienização, sobre quais hortaliças foram tratadas e também não foi feita a verificação da concentração da solução clorada.

Em relação ao risco de contaminação cruzada, foi observada na bancada de manipulação a presença de materiais usados em outros processos e não sanitizados como: facas, copos descartáveis, prancha de corte, bandejas plásticas, ralador e liquidificador, todos desnecessários para o processo de higienização. Em todas as avaliações realizadas os vegetais ficaram parcialmente imersos na solução clorada.

5.2 Avaliação da qualidade microbiológica de alfaces: higienizadas na UAN e no laboratório

As contagens de bactérias mesófilas estão apresentadas na Figura 3 e coliformes totais e termotolerantes na Tabela 3. As concentrações iniciais de cloro livre da solução clorada variaram entre 54 e 133 mg/L nas higienizações realizadas na UAN. As concentrações de cloro livre da solução clorada atingiram valores iniciais de 102 e 199 mg/L nos processos realizados no laboratório.

Todas as amostras de alfaces recebidas na UAN apresentaram contagens de bactérias mesófilas acima de 10^6 UFC/g. Após o processo de higienização, as amostras de AH1 e AH2 apresentaram contagens de mesófilos entre 10^6 a 10^5 UFC/g. Em relação aos coliformes totais, 80% das amostras de AR apresentaram contagens acima de 10^3 NMP/g. Para as amostras de AH1 as contagens de coliformes totais variaram entre 4,3 e 240 NMP/g. As amostras de AH2 variaram entre 9,3 e 240 NMP/g. Para coliformes termotolerantes foram detectadas contagens superiores a 10^2 NMP/g em duas amostras de AR, em relação a AH1 apenas uma amostra apresentou contagem de 46 NMP/g para os coliformes termotolerantes. Para as amostras de AH2 todas as amostras apresentaram contagens inferiores a 10 NMP/g para coliformes termotolerantes.

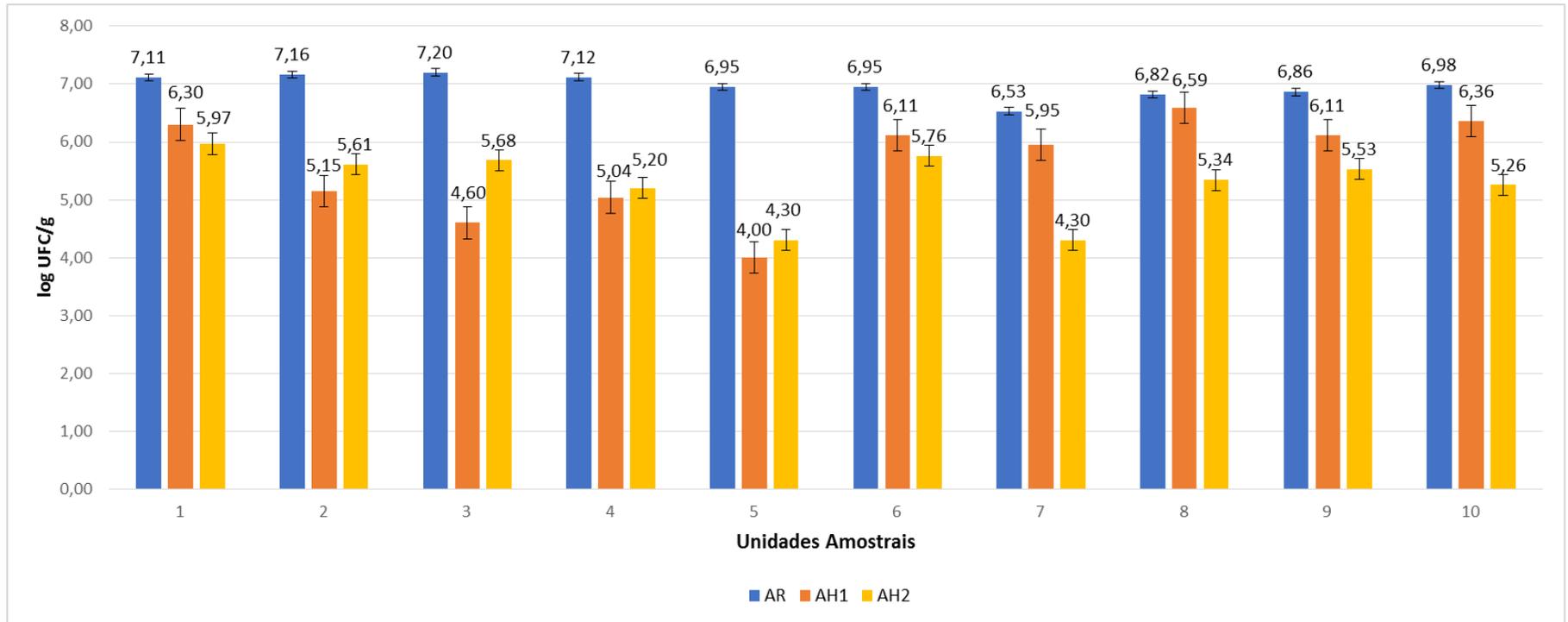


Figura 3 – Características microbiológicas (bactérias mesófilas) em alfaces recebidas e submetidas à higienização na UAN e no laboratório. Resultado das 10 análises das unidades amostrais

log UFC/g: logaritmo de unidade formadora de colônia por grama; AR: alfaces recebidas na UAN; AH1: alfaces higienizadas na UAN; AH2: alfaces higienizadas no laboratório

Tabela 3 – Características microbiológicas de alfaces submetidas à higienização em diferentes condições

Amostras	Coliformes Totais (NMP/g)			Coliformes Termotolerantes (NMP/g)		
	AR	AH1	AH2	AR	AH1	AH2
1	> 2400	46	110	110	< 3	9,3
2	> 2400	240	24	240	< 3	< 3
3	1100	4,3	9,3	9	< 3	4,3
4	> 2400	9,3	110	21	< 3	< 3
5	1100	4,3	9,3	4,3	< 3	< 3
6	> 2400	110	240	15	46	7,5
7	> 2400	9,3	110	4,3	< 3	4,3
8	1100	110	46	< 3	< 3	< 3
9	460	4,3	9,3	< 3	< 3	< 3
10	46	110	24	< 3	< 3	< 3

NMP/g – Número Mais Provável por grama; AR – alfaces recebidas na UAN; AH1- alfaces higienizadas na UAN; AH2 - alface higienizada no laboratório

Ao analisar a redução da microbiota das alfaces, verificou-se que a higienização realizada pelos manipuladores da UAN resultou em uma redução mediana de 0,9 log UFC/g e 3,23 log NMP/g nas contagens de bactérias mesófilas e coliformes totais, respectivamente. Isto representa uma diferença estatística significativa na mediana das contagens de bactérias mesófilas (p-valor 0,005) e coliformes totais (p-valor 0,007) (Tabela 4). Em relação aos coliformes termotolerantes, houve uma redução de 0,55 log NMP/g não sendo estatisticamente significativa (p-valor 0,128).

Quando a higienização das alfaces foi realizada pela equipe do laboratório, a redução nas contagens de bactérias mesófilas foi de 1,5 log UFC/g. Para coliformes totais e termotolerantes as reduções foram de 3,23 e 0,55 log NMP/g, respectivamente. A redução obtida nas contagens de bactérias mesófilas e coliformes totais foi estatisticamente significativa, ambas com p-valor 0,005. Em relação aos coliformes termotolerantes não houve diferença estatística significativa (p-valor 0,028) (Tabela 5).

Tabela 4 - Comparação do processo de higienização realizado em condições de rotina da UAN

Microrganismos	Unidade	Alfaces Recebidas na UAN (AR)		Alfaces Higienizadas na UAN (AH1)			p-valor
		Mediana	Contagem Mín. e Máx.	Mediana	Contagem Mín. e Máx.	Redução	
Bactérias Mesófilas Totais	log UFC/g	6,9	6,5 - 7,2	6,0	4,0 a 6,6	0,9	0,005
Coliformes Totais	NMP/g	1750,0	46,0 - 2400,0	27,6	4,0 a 240,0	1722,4	0,007
Coliformes Termotolerantes	NMP/g	6,6	3,0 - 240,0	3,0	3,0 a 46,0	3,6	0,128

log UFC/g: logaritmo de Unidade Formadora de Colônia por grama; NMP/g: Número Mais Provável por grama; Min.- mínima; Máx. – máxima
Realizado Wilcoxon Signed Ranks test ao nível de significância de 5%

Tabela 5 - Comparação do processo de higienização realizado em condições de laboratório

Microrganismos	Unidade	Alfaces Recebidas na UAN (AR)		Alfaces Higienizadas no Laboratório (AH2)			p-valor
		Mediana	Contagem Mín. e Máx.	Mediana	Contagem Mín. e Máx.	Redução	
Bactérias Mesófilas Totais	log UFC/g	6,9	6,5 - 7,2	5,4	4,3 - 5,9	1,5	0,005
Coliformes Totais	NMP/g	1750,0	46,0 - 2400,0	35,0	9,0 - 240,0	1715,0	0,005
Coliformes Termotolerantes	NMP/g	6,6	3,0 - 240,0	3,0	3,0 - 9,0	3,6	0,028

log UFC/g: logaritmo de Unidade Formadora de Colônia por grama; NMP/g: Número Mais Provável por grama; Min.- mínima; Máx. – máxima
Realizado Wilcoxon Signed Ranks test ao nível de significância de 5%

Ao comparar os processos de higienização realizados pelos manipuladores e pela equipe do laboratório durante os 10 dias de experimento, não foi verificada diferença estatística significativa entre as contagens de bactérias mesófilas (p-valor 0,256), coliformes totais (p-valor 0,462) e coliformes termotolerantes (p-valor 0,196) (Tabela 6). Apesar da não existência de diferença estatística significativa, foi constatado um maior número de dias de experimentos em que, comparativamente, o processo realizado pela equipe do laboratório resultou na maior redução nos microrganismos pesquisados.

O processo de higienização das alfaces realizado pelos manipuladores da UAN resultou na redução da contagem de bactérias mesófilas superior a 1 log UFC/g em 40% dos experimentos. Esta mesma redução foi obtida em 100% dos experimentos realizados em condições de laboratório.

Em relação aos coliformes totais foi observada uma redução de 1 log NMP/g em 90% das amostras higienizadas pelos manipuladores da UAN. Quando o processo foi realizado no laboratório esta redução foi observada em 100% das amostras.

Para os coliformes termotolerantes houve redução de 1 log NMP/g em 3 das 7 amostras em que estes microrganismos foram detectados. Nos processos de higienização realizados no laboratório houve redução de 1 log NPM/g em 4 das 7 amostras em que os coliformes termotolerantes foram detectados.

Duas amostras recebidas dos fornecedores apresentaram contagens de coliformes termotolerantes maiores que 10^2 UFC/g, quando comparadas com os valores da categoria de “Hortaliças, legumes e similares, incluindo cogumelos (fungos comestíveis) frescas, *in natura*, preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas) sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto, com exceção de cogumelos” segundo a RDC n.º 12/2001, seriam consideradas inadequadas para consumo (Brasil, 2001). Os resultados destas amostras quando higienizadas atenderam às recomendações da legislação. Ambas tiveram as contagens de coliformes termotolerantes reduzidas para níveis seguros, tanto nos tratamentos realizados na UAN, quanto pela equipe do laboratório.

Tabela 6 - Comparação do processo de higienização realizado em condições de rotina da UAN e em laboratório

Microrganismos	Unidade	Alfaces Higienizadas na UAN (AH1)		Alfaces Higienizadas no Laboratório (AH2)		p- valor
		Contagem Mín. e Máx.	Mediana	Contagem Mín. e Máx.	Mediana	
Bactérias Mesófilas Totais	log UFC/g	4,0 a 6,6	6,0	4,3 - 5,9	5,4	0,256
Coliformes Totais	NMP/g	4 a 240	27,6	9,0 - 240,0	35,0	0,462
Coliformes Termotolerantes	NMP/g	3 a 46	3,0	3,0 - 9,0	3,0	0,196

log UFC/g: logaritmo de Unidade Formadora de Colônia por grama; NMP/g: Número Mais Provável por grama; Min.- mínima; Máx. – máxima
 Realizado Wilcoxon Signed Ranks test ao nível de significância de 5%

5.3 Avaliação microbiológica das soluções cloradas obtidas da higienização realizada pelos manipuladores e equipe do laboratório

As análises microbiológicas pela técnica de plaqueamento e por filtração em membrana das soluções cloradas resultantes das amostras de AH1 e AH2 não evidenciaram a presença de microrganismos detectáveis para bactérias mesófilas, coliformes totais e coliformes termotolerantes, segundo as metodologias propostas neste estudo.

5.4 Análise das características físico-químicas da solução clorada resultante do processo de sanitização de alfaces

As concentrações médias de NaDCC na solução e os valores médios aferidos com fita dosadora de cloro livre e o tempo médio de sanitização das alfaces higienizadas pelos manipuladores da UAN e pela equipe do laboratório estão apresentadas na Tabela 7.

Houve diferença significativa nos tempos inicial e final das amostras AH1 e AH2 em relação à concentração de NaDCC (p-valor <0,001). Os valores aferidos pela fita de dosagem de cloro apresentaram diferença significativa entre as médias das amostras (p-valor <0,001). O tempo médio de sanitização foi maior nas amostras de AH1 em referência ao tempo recomendado pelo fabricante.

Tabela 7 – Concentração média de solução de dicloroisocianurato de sódio e tempo médio de sanitização em diferentes condições de tratamento de alfaces

Amostras	NaDCC (mg/L)		Fita dosagem de cloro (mg/L)		Sanitização ¹ (minutos)
	tempo inicial	tempo final	tempo inicial	tempo final	
AH1	82,3 ± 21,1	87,3 ± 38,6	150,0 ± 50,0	150,0 ± 50,0	20,5 ± 7,3
AH2	172,2 ± 27,7	170,0 ± 27,2	200,0 ± 0,0	200,0 ± 0,0	11,1 ± 1,2

NaDCC- dicloroisocianurato de sódio; mg/L - miligramas por litro; ¹ Tempo de sanitização recomendado pelo fabricante–10 minutos. AH1- alfaces higienizadas na UAN; AH2 - alfaces higienizadas no laboratório

5.5 Efeito da solução de NaDCC em alfaces intencionalmente contaminadas com *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Escherichia coli* ATCC 11229

Os resultados obtidos a partir das amostras intencionalmente inoculadas estão apresentados na Figura 4.

Nas amostras de alfaces intencionalmente contaminadas, a concentração de *E. coli* na suspensão inoculante foi de 8,0 log UFC/mL, que resultou em uma contaminação média nas

folhas de 6,81 log UFC/g. O tratamento reduziu a contagem microbiana em 1,42 log UFC/g. No processo com o reúso da solução clorada a redução da contagem de *E. coli* na segunda unidade amostral de alface foi de 1,58 log UFC/g.

Na avaliação do efeito higienização com a solução de reúso em alfaces intencionalmente contaminadas com *L. monocytogenes*, a partir da solução inoculante contendo 8,81 log UFC/mL, foi obtida uma contaminação de 6,64 log UFC/g nas amostras de alfaces. Após o tratamento com o NaDCC, na primeira unidade amostral de alface higienizada houve uma redução média de 1,26 log UFC/g. O reúso da solução clorada na higienização da segunda unidade amostral resultou em uma redução média de 0,20 log UFC/g.

O reúso da solução clorada resultou em uma redução na concentração de cloro livre que variou entre 20 e 30%. As análises microbiológicas das soluções utilizadas no tratamento das alfaces intencionalmente contaminadas por *E. coli* e *L. monocytogenes* não evidenciaram a presença destes microrganismos em 100 mL das soluções de uso e reúso.

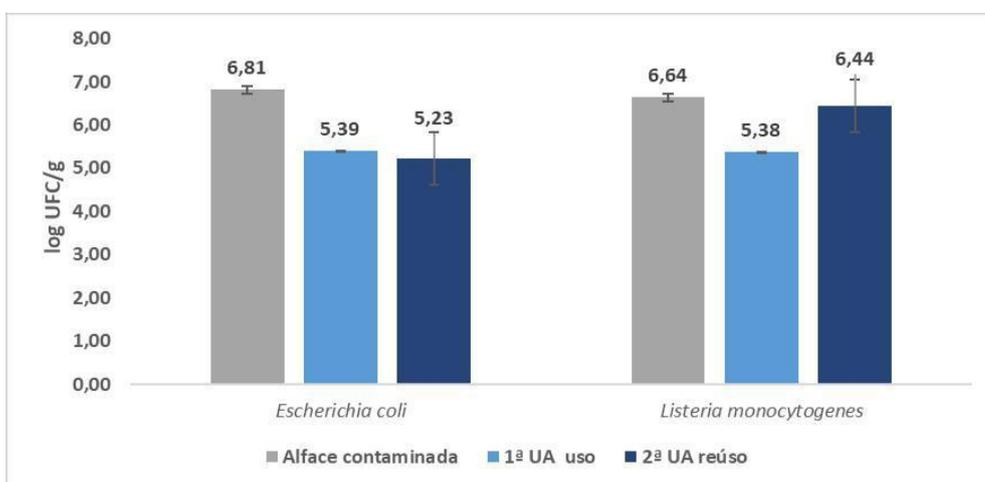


Figura 4 - Sobrevivência de *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Escherichia coli* ATCC 11229 em folhas de alface após tratamento com solução clorada de primeiro uso e de reúso. UA – unidade amostral, log UFC/g – logaritmo de Unidade Formadora de Colônia por grama, ATCC - *American Type Culture Collection*

6 DISCUSSÃO

As mudanças ocorridas na sociedade resultaram no aumento do consumo de refeições fora do lar, bem como na crescente busca por uma alimentação mais saudável. Como consequência do aumento no volume de produção e da busca por alimentos menos industrializados, os riscos de ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos aumentaram. Isto tornar-se mais grave nos alimentos consumidos crus, como as frutas e hortaliças, e principalmente os oferecidos em UAN, que apesar de apresentar uma equipe de profissionais envolvida na produção, o grande volume de produção e o público algumas vezes específico, como pacientes hospitalizados ou crianças em idade escolar, agravam o risco.

As falhas observadas com a avaliação do processo de higienização realizado na UAN em estudo foram majoritariamente relacionadas à falta de orientações a respeito do procedimento adequado de sanitização e ao preparo adequado da solução clorada. Schattan (2006) avaliou a percepção do risco de DTA pelo consumo de vegetais crus através de um questionário validado por Lynch (2003) e aplicado em 49 restaurantes no município de Santos-SP. O estudo constatou baixa percepção pelos manipuladores para este risco, mostrando que, apenas 36,7% higienizavam corretamente os alimentos. Os autores sugerem que essa baixa percepção seja decorrente da falta de conhecimento sobre a forma correta da higienização de alimentos consumidos crus.

No presente estudo, o controle de tempo da sanitização de vegetais foi realizado em todos os dias da avaliação, onde foi respeitado o tempo mínimo de contato da solução clorada. Entretanto, em dois dias os manipuladores excederam o tempo recomendado em 30 minutos devido à sobrecarga de trabalho. Dependendo do tipo de produto e sua concentração de uso, esta não conformidade pode resultar em perdas sensoriais do produto. Por outro lado, em um estudo utilizando 200 mg/L de hipoclorito de sódio durante 30 minutos, Oliveira *et al.* (2012) avaliaram a eficiência do processo de sanitização de alfaces em restaurantes, onde este tempo de tratamento resultou em uma redução de 2,46 log UFC/g de bactérias mesófilas, que foi superior à obtida com o tempo normalmente utilizado, entre 10 à 15 minutos. Resultados semelhantes quanto à adequação ao tempo de contato com a solução foram obtidos por Frantz *et al.* (2008), que avaliaram 13.507 hortaliças submetidas ao processo de higienização em 15 UAN do Estado do Rio Grande do Sul. Os autores constataram que o tempo de sanitização foi respeitado em 97,36% das higienizações de hortaliças.

Durante o estudo a medição dos volumes de cloro a ser adicionado nas soluções era realizada visualmente e por aproximação do volume estipulado pelo medidor que acompanha

o frasco original do produto, o que pode explicar os valores médios de cloro residual encontrados, que estavam abaixo dos valores recomendados.

Todas as falhas observadas durante a rotina de trabalho dos manipuladores na UAN estavam relacionadas à falta de treinamento, documentação de orientação como as planilhas de registros e definição das responsabilidades. Segundo Tondo e Bartz (2011) os estabelecimentos sem registro para o controle eficiente da qualidade dos alimentos não possuem corretamente o histórico de melhorias e não têm como provar que os procedimentos estão sendo realizados de forma adequada. Em um estudo realizado por Quintiliano *et al* (2008) foi constatado que a higienização dos utensílios e equipamentos era incorreta e que os restaurantes avaliados não dispunham do registro dos procedimentos de higienização e do responsável capacitado para tal atividade. Pereira, Rodrigues e Ramalhosa (2013) avaliaram as influências das práticas e as condições de trabalho na qualidade de salada de alfaces frescas. Foram encontrados protocolos inadequados de higienização de alface por meio de análises microbiológicas e físico-químicas. A adoção de condutas inadequadas pelos manipuladores de alimentos pode favorecer a contaminação. Silva, Cavalli e Oliveira (2006), avaliando procedimentos de higienização em unidade de alimentação no Rio Grande do Sul, verificaram a presença de coliformes totais (10^2 a 10^3 NMP/cm²), coliformes termotolerantes (10^2 NMP/cm²), fungos filamentosos e leveduras (10^2 UFC/cm²), *Salmonella* sp. (10 a 10^2 UFC/cm²) e *Staphylococcus* coagulase positiva (10^2 UFC/cm²) em equipamentos e utensílios utilizados no preparo de alimentos. O treinamento dos manipuladores e implantação de procedimentos de higienização adequados resultou na redução considerável dos níveis de contaminação. Soares (2011) verificou a segurança dos alimentos a partir da avaliação do nível de conhecimento, atitudes e práticas dos manipuladores de alimentos na rede municipal de ensino de Camaçari-BA e observou que o conhecimento está associado com o maior nível de escolaridade, menor jornada de trabalho e com o fato do manipulador ter um vínculo profissional estável.

As amostras de alfaces recebidas na UAN quando analisadas microbiologicamente devem ser enquadradas na categoria de “Hortaliças, legumes e similares, frescas, *in natura*, inteiras, selecionadas ou não, com exceção de cogumelos segundo a RDC n.º 12/2001 da ANVISA. Nesta categoria é exigida apenas a pesquisa de *Salmonella* sp., tendo como valor de referência, ausência em 25g do alimento (Brasil, 2001). Para avaliar os processos de higienização durante o estudo com as alfaces recebidas na UAN foram realizadas as análises de contagem de bactérias aeróbias mesófilas, coliformes totais e termotolerantes. A pesquisa de *Salmonella* sp. não foi realizada uma vez que a frequência de isolamento deste patógeno é

normalmente baixa, bem como as concentrações encontradas. Desta forma, os efeitos de sua redução no processo de higienização não seriam percebidos através da metodologia proposta para este estudo. No estudo de Shinohara *et al.* (2014) foram avaliadas 60 amostras de alfaces na cidade de Recife-PE coletadas em diferentes supermercados e feiras livres. Foi constatada a ausência de *Salmonella* sp. em todas as amostras analisadas. Da mesma forma, contaminação de alfaces por *Salmonella* sp. foi estudada por Santos *et al.* (2010), que pesquisaram 72 amostras de alfaces em diferentes cultivos (convencional, orgânico e hidropônico) obtidas em feiras no estado de São Paulo. Os autores não detectaram a presença de *Salmonella* sp. Bobco *et al.* (2011) analisaram 15 amostras de alfaces provenientes de feira e supermercado, a presença de *Salmonella* sp. não foi observada em nenhuma das amostras.

No presente estudo, as contagens de coliformes totais e termotolerantes nas amostras de alfaces recebidas na UAN estão de acordo com os achados de Santos *et al.* (2012), em que as amostras de alfaces comercializadas em Teresina-PI apresentaram contagens médias de 10^3 NMP/g para coliformes totais, 10 NMP/g para coliformes termotolerantes. Nascimento, Silva e Catanozi (2003) apresentaram níveis de coliformes termotolerantes em alfaces inferiores a 10^4 NMP/g nas hortaliças comercializadas em Campinas-SP. Todas as amostras de alfaces recebidas na UAN apresentaram contagens elevadas de coliformes totais e nas contagens de termotolerantes duas amostras apresentaram níveis acima de 10^2 NMP/g, tais valores podem indicar falhas durante o transporte ou no armazenamento das alfaces.

A contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas não é contemplada na legislação brasileira para este tipo de alimento. Segundo a Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (*International Commission on Microbiological Specifications for Foods* - ICMSF), quando contagens de bactérias mesófilas atingem valores de 6 log UFC/g, os vegetais podem apresentar sinais de deterioração, e conseqüentemente se tornarem inadequados para o consumo (ICMSF, 1986). Embora 100% das amostras de alfaces recebidas na UAN tenham apresentado contagens superiores a estes valores, nenhuma amostra apresentava sinal de deterioração. A relação entre a carga microbiana e os efeitos na deterioração do vegetal não é uma regra geral, ela depende do grupo de microrganismos presentes. Deve-se considerar que para ambientes tropicais, as altas temperaturas médias podem resultar em um rápido aumento da carga microbiana. Os valores encontrados neste estudo apresentaram contagens mais altas do que as obtidas em outros estudos que analisaram alfaces adquiridas em feiras e mercados. No estudo realizado no Mato Grosso do Sul por Arbos *et al.* (2010), a contagem de bactérias mesófilas variou entre 3,99 e

5,20 log UFC/g. No estudo de Medeiros (2014) foram encontrados em 80% das amostras valores entre 5,47 e 5,60 log UFC/g de bactérias mesófilas em alfaces adquiridas em supermercados no município de Santa Maria-RS. No entanto, o estudo de França, Bonnas e Silva (2014), foram observados os valores mais elevados, que variaram entre 7,91 e 6,05 log UFC/g para bactérias mesófilas nas alfaces comercializadas em feiras em Uberlândia-MG, valores que se assemelham aos encontrados no presente estudo. O armazenamento em temperaturas altas (em torno de 20 °C) aumentou a probabilidade de crescimento de bactérias patogênicas em alfaces (Abadias *et al.*, 2011; Robin *et al.*, 2014). As amostras de alface submetidas aos tratamentos de imersão em soluções contendo 70, 100 e 130 mg/L de hipoclorito de sódio apresentavam aparência deteriorada no terceiro dia de armazenamento em temperatura de 20°C (Berbari, Paschoalino e Silveira, 2001). A contagem elevada de bactérias mesófilas nas alfaces recebidas na UAN pode indicar falhas no transporte ou na estocagem desse gênero alimentício, dado que, o transporte de hortaliças e frutas deve ser realizado sob refrigeração, para preservação das características sensoriais e manutenção da carga microbiana pós colheita (Brasil, 2004).

A higienização adequada com solução de hipoclorito resulta em uma redução de microrganismos entre 1 e 3 log UFC/g em vegetais, estes valores têm sido obtidos por diversos autores como Ssemenda *et al.* (2017); Prado-Silva *et al.* (2015); Pereira, Rodrigues, Ramalhosa, (2013); López-Gálvez *et al.* (2009). O processo realizado no laboratório atendeu integralmente aos protocolos de higienização propostos pelos manuais estabelecidos pela ABNT (2016) e ABERC (2015), diferente dos realizados na UAN. A interpretação individual dos resultados comparativos dos 10 experimentos mostra que o processo realizado no laboratório resultou em um número maior de processos com maior redução dos que os realizados na UAN, principalmente no que se refere às contagens de bactérias mesófilas e coliformes termotolerantes. Este fato pode representar o risco de maior exposição de consumidores a microrganismos patogênicos e a ocorrência de surto de DTA.

Ainda, que os manipuladores na UAN tenham utilizado concentrações mais baixas na solução clorada, o tempo excedido no processo pode ser o responsável pelos resultados semelhantes aos encontrados pela equipe que realizou os procedimentos adequados, conforme os achados de Oliveira *et al.* (2012), mostrando que o aumento do tempo de exposição ao cloro pode ter resultado em maior redução de bactérias mesófilas.

Os processos realizados, tanto pelos manipuladores na UAN quanto pela equipe no laboratório atingiram redução de aproximadamente 1 log UFC/g na contagem de bactérias mesófilas e coliformes termotolerantes. Estes achados são compatíveis com os de outros

estudos em que a sanitização foi realizada com hipoclorito de sódio (Mariano, Teixeira e Okura, 2005; Figueiredo, 2013).

Poucos estudos abordam a redução da carga de microrganismos e compararam os efeitos do dicloroisocianurato de sódio com os do hipoclorito de sódio. No presente trabalho todos os resultados foram comparados a estudos que utilizaram apenas hipoclorito de sódio. Em princípio, a vantagem do dicloroisocianurato de sódio refere-se à maior persistência da atividade antibacteriana exercida pelos isocianuratos clorados presentes na solução. A ação do dicloroisocianurato de sódio também pode resultar em um prolongamento da ação pela disponibilização de 50% do cloro total livre do dicloroisocianurato de sódio em comparação a disponibilidade de 100% do hipoclorito de sódio, afetando a cinética da reação bactericida (Clasen e Edmondson, 2006). No estudo de Porto (2006) foram realizados ensaios de sanitização de alfaces inoculadas com 8 log UFC/g *L. monocytogenes* e tratadas com 100 mg/L de hipoclorito de sódio e 100 mg/L de dicloroisocianurato de sódio durante 15 minutos. Foram obtidas reduções de 1,9 e 2,3 log UFC/g para o hipoclorito de sódio e dicloroisocianurato de sódio, respectivamente.

Atualmente, além do aspecto de segurança, a sustentabilidade também representa um importante ponto a ser considerado na cadeia de produção de alimentos. Assim, a redução do consumo de água representa um ponto primordial na produção alimentos. Neste caso, a redução no uso de água deve ser avaliada mais profundamente, uma vez que representa o principal fator associado à higiene dos alimentos. Uma das formas sugeridas na redução do consumo de água no processo é o reúso da solução clorada, que também resulta na redução de emissão de cloro no ambiente, bem como nos custos com a aquisição do produto. No estudo de Lustosa e Mendes (2016), nas etapas de lavagem, sanitização e enxágue foi observado um consumo de água de 18 a 27 L/kg de hortaliças folhosas (rúcula, agrião, espinafre, alface crespa e americana), quanto mais reentrâncias das folhas, mais água foi necessária na etapa de lavagem. No presente estudo a solução clorada foi capaz de reduzir de forma semelhante às contagens na alface intencionalmente contaminadas com *E. coli*, tanto nas soluções de primeiro uso quanto de reúso. Entretanto, quando as alfaces foram inoculadas com *L. monocytogenes* só foi observada a redução das contagens na solução de primeiro uso. As concentrações de cloro livre nas soluções de reúso eram compatíveis com as recomendadas para uso, indicando a presença de um fator adicional na determinação da falha na inibição de *L. monocytogenes*.

Os resultados levantam a suspeita de que a eficiência da reutilização de soluções cloradas pode ser espécie ou estirpe específica. Os riscos de manutenção da contaminação ou

contaminação cruzada são evidentes. A maior redução da carga microbiana promovida pela solução de primeiro uso pode estar associada ao aumento da concentração de matéria orgânica em relação à solução de reúso, mas não interferindo na capacidade de detecção de cloro livre. No estudo de Luo (2007) o uso repetido da água para higienizar as alfaces fracionadas causou deterioração da qualidade da água e declínio no nível de cloro livre. A eficácia antimicrobiana do cloro apresenta um maior potencial quando a matéria orgânica é controlada ou eliminada (Gil *et al.* 2009).

L. monocytogenes, entre outros microrganismos, apresenta fatores de patogenicidade ou virulência, sendo resistente a ambientes extremos e apresentam capacidade de modular expressão de genes em respostas a estas condições (Stella, 2009; Barros *et al.*, 2012), fatores que poderiam justificar os achados do presente estudo. Este patógeno é reconhecido por habitar e sobreviver em condições adversas como, estresse osmótico com alta concentração de cloreto de sódio, ampla faixa de temperaturas, pH e a outras situações como ao tratamento químico com cloro e antibióticos. O genoma de *L. monocytogenes* codifica diferentes classes de genes de resposta ao estresse e mecanismos gerais para sobreviver a uma ampla variedade de condições ambientais, entre eles, a produção de proteínas de estresse. Esse mecanismo resulta no aumento da resistência deste microrganismo a estas condições (Veen *et al.*, 2007; Ribeiro, 2012; Souza, Tebaldi e Piccoli, 2015; Kocaman e Sarimehmetoglu, 2016).

Em ambientes de produção de alimentos onde há processo de higienização inadequado, com utilização de produtos sanitizantes abaixo das concentrações ótimas de uso, pode haver a indução de resistência de microrganismos por estresse microbiano.

A avaliação da atividade antimicrobiana de produtos sanitizantes na indústria alimentícia é preconizada pela RDC n.º 14/2007 que recomenda a realização do teste com estirpes de referência de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Choleraesuis* e *E. coli*. Dentre estes microrganismos nenhum apresenta o perfil de resistência às condições ambientais semelhantes à *Listeria*, um importante e frequente patógeno no ambiente de produção de alimentos, fato que sugere a inclusão deste microrganismo em testes de avaliação da atividade antimicrobiana de produtos de uso industrial e de aplicação na produção de alimentos (Brasil, 2007).

7 CONCLUSÕES

Neste estudo foram detectadas falhas decorrentes da falta de capacitação dos manipuladores e sistematização dos processos.

Apesar das não conformidades evidenciadas, os processos realizados na UAN foram compatíveis com os realizados no laboratório e reduziram a contaminação a níveis seguros.

O reúso da solução clorada mostrou reduções na população de *E. coli* ATCC 11229 intencionalmente contaminada em alfaces, porém não exerceu efeito *L. monocytogenes* ATCC 19117.

Os resultados sugerem que a prática de reúso tenha efeito somente em alguns grupos microbianos, e represente uma possibilidade de exposição de consumidores a patógenos com resistência a sanitizantes.

O estudo propõe a inclusão de microrganismos como *L. monocytogenes* nos testes de avaliação da atividade de compostos antimicrobianos de uso na indústria de alimentos. Estudos complementares estão sendo realizados para o melhor entendimento deste processo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abadias, M., Alegre, I., Usall, J., Torres, R. e Viñas, I. (2011). Evaluation of alternative sanitizers to chlorine disinfection for reducing foodborne pathogens in fresh-cut apple. *Postharvest Biology and Technology*. 59, 289-297.

ABCSEM (2013). Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas. O Mercado de Folhosas: Números e Tendências. Disponível em: https://www.abcsem.com.br/upload/arquivos/O_mercado_de_folhosas_Numeros_e_Tendencias_-_Steven.pdf. Acesso em: 08/03/2019.

ABCSEM (2014). Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas. 2º levantamento de dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil – Ano base 2012. Disponível em: http://www.abcsem.com.br/imagens_noticias/Apresenta%C3%A7%C3%A3o%20completa%20dos%20dados%20da%20cadeia%20produtiva%20de%20hortali%C3%A7as%20-%202029MAIO2014.pdf. Acesso em: 08/03/2019.

ABERC (2015). Associação Brasileira de Empresas de Refeições Coletivas. Manual ABERC de Práticas de Elaboração e Serviço de Refeições para Coletividades. 11 ed. São Paulo, 288 p.

ABERC (2018). Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas. Mercado Real. Disponível em: <http://www.aberc.com.br/mercadoreal.asp?IDMenu=21>. Acesso em: 05/05/2019.

ABNT (2015). Associação Brasileira de Normas Técnicas. Norma Brasileira (NBR) 15635:2015. Serviços de alimentação – Requisitos de boas práticas higiênico-sanitárias e controles operacionais essenciais. Rio de Janeiro, 21 p.

ABNT (2016). Associação Brasileira de Normas Técnicas. Cartilha sobre Boas Práticas para Serviços de Alimentação. 3 ed. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/389979/Cartilha+Boas+Pr%C3%A1ticas+para+Servi%C3%A7os+de+Alimenta%C3%A7%C3%A3o/d8671f20-2dfc-4071-b516-d59598701af0>. Acesso em: 22/02/2019.

Abreu, E.S., Spinelli, M.G.N. e Pinto, A.M.S. (2011). Gestão de Unidades de Alimentação e Nutrição: um modo de fazer. 5 ed. (São Paulo: Metha), pp 378.

Akutsu, R.C., Botelho, R.A., Camargo, E.B., Sávio, K.E.O. e Araújo, W.C. (2005). Adequação das boas práticas de fabricação em serviços de alimentação. *Revista de nutrição*. 18, 419-427.

Andarwulan, N., Kurnissih, D., Apridy, R.A., Rahmath, H., Roto, A.V. e Boling, B.W. (2012). Polyphenols, carotenoids, and ascorbic acid in underutilized medicinal vegetables. *Journal of Functional Foods*. 4, 339-347.

Andrade, N.J. e Pinto, C.L.O. (2008). Higienização na indústria de alimentos e segurança alimentar. In Ferramentas da ciência e tecnologia para a segurança dos alimentos. Bastos, M.S.R., eds. (Fortaleza: Embrapa Agroindustrial Tropical), pp 41-66.

APHA (1999). American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21 ed. (Washington, D.C: American Water Works Association e Water Environment Federation), pp. 1569.

APHA (2001). American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4 ed. (Washington, D.C: American Water Works Association e Water Environment Federation), pp. 676.

- Arbos, K.A., Ferrari, F.J., Marcellino, T.G., Carvalho, L.A. e Freitas, R.S. (2010). Avaliação microbiológica de alface e água de irrigação das hortas do projeto verde- SESC/MS. *Higiene Alimentar*. 14, 69-74.
- Athayde, D.R., Flores, D.R.M., Silva, J.S., Silva, M.S., Genro, A.L.G., Wagner, R., Campagnol, P.C.B., Menezes, C.R. e Cichoski, A.J. (2018). Characteristics and use of electrolyzed water in food industries. *International Food Research Journal*. 25, 11-16.
- Barbosa, V.A.A., Filho, F.C.C., Silva, A.X.L., Oliveira, D.G.S., Albuquerque, W.F. e Barros, V.C. (2016). Comparação da contaminação de alface (*Lactuca sativa*) proveniente de dois tipos de cultivo. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. 10, 231-242.
- Barros, M.R., Silveira, W.D., Araújo, J.M., Costa, E.P., Oliveira, A.A.F., Santos, A.P.S.F., Silva, V.A.S. e Mota, R.A. (2012). Resistência antimicrobiana e perfil plasmidial de *Escherichia coli* isolada de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 32, 405-410.
- Beirão-da-Costa, S., Moura-Guedes, M.C., Ferreira-Pinto, M.M., Empis, J. e Moldão-Martins, M. (2014). Alternative sanitizing methods to ensure safety and quality of fresh-cut kiwifruit. *Journal of Food Processing and Preservation*. 38, 1-10.
- Bendini, A., Cerretani, L., Pizzolante, L., Toschi, T.G., Guzzo, F., Ceoldo, S., Marconi, A.M., Andreatta, F. e Levi, M. (2006). Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of *Passiflora* spp. extracts. *European Food Research and Technology*. 223, 102-109.
- Berbari, S.A.G, Paschoalino, J.E. e Silveira, N.F.A. (2001). Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 21, 197-201.
- Bettiol, W., Ghini, R., Galvão, J.A.H. e Siloto, R.C. (2004). Sistemas orgânicos e convencionais de tomate. *Scientia Agrícola*. 61, 253-259.
- Bobco, S.E., Pierozan, M.K., Cansian, R.L., Oliveira, D., Pinheiro, T.L.F. e Toniazzo, G. (2011). Condições higiênicas de alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas na cidade de Erechim-RS. *Alimentos e Nutrição Araraquara*. 22, 301-305.
- Brasil (2001). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n.º 12 de 02 de janeiro de 2001. Dispõe sobre Regulamento técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b. Acesso em: 20/01/2019.
- Brasil (2002). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n.º 272 de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_275_2002_COMP.pdf/fce9dac0-ae57-4de2-8cf9-e286a383f254. Acesso em: 09/03/2019.
- Brasil (2004). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n.º 216 de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388704/RESOLU%25C3%2587%25C3%2583O-RDC%2BN%2B216%2BDE%2B15%2BDE%2BSETEMBRO%2BDE%2B2004.pdf/23701496-925d-4d4d-99aa-9d479b316c4b>. Acesso em: 20/01/2019.

Brasil (2007). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº. 14 de 28 de fevereiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos com Ação Antimicrobiana, harmonizado no âmbito do Mercosul. Disponível em: <https://cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201611/08140937-rdc-14-2007.pdf>. Acesso em: 25/04/2019.

Brasil (2013). Portaria CVS 5 de 09 de abril de 2013. Aprova o regulamento técnico sobre boas práticas para estabelecimentos comerciais de alimentos e para serviços de alimentação e o roteiro de inspeção, anexo. Disponível em: http://www.cvs.saude.sp.gov.br/up/PORTARIA%20CVS-5_090413.pdf. Acesso em: 22/02/2019.

Brasil (2014). Ministério da Saúde. Guia Alimentar para a População Brasileira. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_alimentar_populacao_brasileira_2ed.pdf. Acesso em: 05/05/2019.

Brasil (2018). Ministério da Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil: Ano base 2000-2017. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>. Acesso em: 19/01/2019.

Brecht, J.K., Ritenour, M.A., Haard, N.F. e Chrism, G.W. (2010). Fisiologia pós-colheita de tecidos vegetais comestíveis. In Química de alimentos de Fennema. Damodaram, S., Parkin, K.L. e Fennema, O.R., eds. 4 ed. (Porto Alegre: Artmed), pp 900.

Caetano, L.C.S., Ferreira, J.M., Araujo, M.L., Silva, V.V., Leal, M.A.A., Andrade, W.E.B., Coelho, R.G., Cunha, H.C., Sarmiento, W.R.M., Cunha, H., Storhm., Costa, R.A. e Silva, J.A.C. (2001). A cultura da alface: perspectivas, tecnologias e viabilidade. (Niterói: Pesagro-Rio), pp 23.

CDC (2012). Centers for Disease Control and Prevention. Effect of Chlorination on Inactivating Selected Pathogens. CDC, EUA, 21 mar. 2012. Disponível em: <https://www.cdc.gov/safewater/effectiveness-on-pathogens.html>. Acesso em: 06/05/2019.

CDC (2018). Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *E. coli* Infections Linked to Romaine Lettuce. CDC, EUA, 9 jan. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/2018/o157h7-11-18/index.html>. Acesso em: 06/05/2019.

Cenci, S.A., Gomes, C.A.O., Alvarenga, A.L.B. e Juíniior, M.F. (2006). Boas práticas de Processamento Mínimo de Vegetais na Agricultura Familiar. In Recomendações Básicas para a Aplicação das Boas Práticas Agropecuárias e de Fabricação na Agricultura Familiar. Fenelon, N.N., eds. 1 ed. (Brasília: Embrapa Informação Tecnológica), pp 59-63.

Chadwick, M., Gawthrop, F., Michelmores, R.W., Wagstaff, C. e Methven, L. (2016). Perception of bitterness, sweetness and liking of different genotypes of lettuce. *Food Chemistry*. 197, 66-74.

Clasen, T. e Edmondson, P. (2006). Sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) tablets as an alternative to sodium hypochlorite for the routine treatment of drinking water at the household level. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 209, 173-181.

Correa, C.M.C., Tibana, A. e Gontijo, P.P.F. (1991). Vegetables as a source of infection with *Pseudomonas aeruginosa* in a University and Oncology Hospital of Rio de Janeiro. *Journal of Hospital Infection*. 18, 301-306.

Coutinho, M.G.S., Ferreira, C.S., Neves, A.M., Alves, F.R.L., Souza, F.F.P. e Fontenelle, R.O.S. (2015). Avaliação microbiológica e parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa* L.) comercializadas em feiras livres no município de Sobral-CE. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*. 13, 388-197.

- Embrapa (2011). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Processamento mínimo de frutas e hortaliças: Tecnologia, qualidade e sistemas de embalagem. 21 ed. (Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos), pp 31-35.
- FAO (2008). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: Meeting Report. Roma. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i0452e.pdf>. Acesso em: 19/01/2019.
- Fernandes, A.M., Andreatta, E. e Oliveira, C.A.F. (2006). Ocorrência de bactérias patogênicas em queijos no Brasil: questão de saúde pública. Revista Higiene Alimentar. 20, 54-56.
- Figueiredo, F.F. (2013). Desinfecção de alfaces por ação do cloro e do vinagre e desenvolvimento de um sistema de segurança para alface em estabelecimentos de restauração coletiva. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, 96 f.
- Filgueira, F.A.R. (2003). Novo Manual de Olericultura – Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2 ed. (Viçosa: UFV), pp 412.
- França, B. R.; Bonnas, D.S. e Silva, C.M.O. (2014). Qualidade higiênico sanitária de alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas em feiras livres na cidade de Uberlândia-MG, Brasil. Bioscience Journal. 30, 458-466.
- Frantz, C.B., Bender, B., Oliveira, A.B.A. e Tondo, E.C. (2008). Avaliação de registros de processos de quinze unidades de alimentação e nutrição. Alimentos e Nutrição Araraquara. 19, 167-175.
- García-Valcárcel, A.I., Loureiro, I., Escorial, C., Molero, E. e Tadeo, J.L. (2016). Uptake of azoles by lamb's lettuce (*Valerianella locusta L.*) grown in hydroponic conditions. Ecotoxicology and Environmental Safety. 124, 138-146.
- Gil, M.I., Selma, M.V., López-Gálvez, F. e Allende, A. (2009). Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. International Journal of Food Microbiology. 134, 37-45.
- Gomiero, T., Pimentel, D. e Paoletti, M.G. (2011). Impacto ambiental de diferentes práticas de manejo agrícola: agricultura convencional vs. agricultura orgânica. Comentários Críticos em Ciências Vegetais. 30, 95-124.
- Henz, G.P. e Suinaga, F.A. (2009). Tipos de alface cultivados no Brasil. (Brasília: Embrapa Hortaliças), pp 7.
- Hitchins, A.D. e Jinneman, K. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. (2011). In Bacteriological analytical manual Online. (EUA: Food and Drug Administration), pp 205-211.
- IBGE (1996). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário: Brasil, 1995-1996. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/48/agro_1995_1996_n1_br.pdf. Acesso em: 24/01/2019.
- IBGE (2010). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv45419.pdf>. Acesso em: 05/05/2019.
- ICMSF (1986). International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Micro-Organisms in Foods 2: Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Specific Applications. 2 ed. (Oxford: Blackwell Scientific Publications), pp. 197-202.

IEA (2014). Instituto de Economia Agrícola. Valor da Produção Agropecuária por Região, Estado de São Paulo, 2014: estimativa preliminar. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/TerTexto.php?codTexto=13553>. Acesso em: 08/03/2019.

Inatsu, Y., Bari, M.L., Kitagawa, T., Kawasaki, S., Vijay, K., Juneja, e Kawamoto, S. (2010). The Effect of Repeated Sodium Hypochlorite Exposure on Chlorine Resistance Development in *Escherichia coli* O157:H7. *Food Science and Technology Research*. 16, 607-612.

Issa-Zacharia, A., Kamitani, Y., Muhimbula, H.S. e Ndabikunze, B.K. (2010). A review of microbiological safety of fruits and vegetables and the introduction of electrolyzed water as an alternative to sodium hypochlorite solution. *African Journal of Food Science*, 4, 778-789.

Jovanovic-Malinovska, R., Kuzmanova, S. e Winkelhausen, E. (2014). Oligosaccharide profile in fruits and vegetables as sources of prebiotics and functional foods. *International Journal of Food Properties*. 17, 949-965.

Kauer, C. e Kapoor, H.C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*. 36, 703-725.

Kocaman, N. e Sarimehmetoglu, B. (2016). Stress responses of *Listeria monocytogenes*. *Veterinary Journal of Ankara University*. 63, 421-427.

Koirala, N., Thuan, N.H., Ghimire, G.P., Thang, D.V. e Sohn, J.K. (2016). Methylation of flavonoids: Chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production. *Enzyme and Microbial Technology*. 86, 103-116.

Leal, D. (2010). Crescimento da alimentação fora do domicílio. *Segurança Alimentar e Nutricional*. 17, 123-132.

Lebeda, A., Ryder, E.J., Grube, R., Dolezalova, I. e Kristkova, E. (2007). Lettuce (*Asteraceae*; *Lactuca* spp.). In *Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement, vegetable crops*. Singh, R.J., eds. (Boca Raton: CRC Press), pp 377-472.

Lee, J., Hwang, Y.S., Lee, J.D., Chang, W.S. e Choung, M.G. (2013). Metabolic alterations of lutein, β -carotene and chlorophyll a during germination of two soy bean sprout varieties. *Food Chemistry*. 141, 3177-3182.

Lizárraga, T.A., Castellón, M. del C. e Mallqui, O.D. (2004). Manejo integral de plagas en una agricultura sostenible: intercambio de experiencia entre Cuba y Perú. *Agroecología*. 1, 8-17.

Loncarevic, S., Johannessen, G.S. e Rorvik, L.M. (2005). Bacteriological quality of organically grown leaf lettuce in Norway. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 186-189.

López-Gálvez, F., Allende, A., Selma, M.V. e Gil, M.I. (2009) Prevention of *Escherichia coli* cross contamination by different commercial sanitizers during washing of fresh-cut lettuce. *The International Journal of Food Microbiology*. 133, 167-17.

Luo Y. (2007). Wash operation affect water quality and packaged fresh-cut romaine lettuce quality and microbial growth. *Hort Science* 42, 1413-1419.

Lustosa, M.M.A. e Mendes, K.A. (2016). Higienização de folhosos e os novos paradigmas da gestão da água em serviços de alimentação. In *Anais eletrônicos do XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Alimentação: a árvore que sustenta a vida*. Gramado, RS. p 16.

- Lynch, R.A. (2003). A comparison of food safety knowledge among restaurant managers by source of training and experience in Oklahoma County, Oklahoma. *Journal Environmental Healthy*. 66, 9-14.
- Macedo, E.R., Fernandes, M.R., Amorim, M.A., Lima, T.L. e Carvalho, L.R. (2018). Perfil epidemiológico de doenças diarreicas agudas notificadas no Hospital Municipal de Una-BA. *Estácio Saúde*. 7, 25-30.
- Macedo, J.A.B. (2004). Uso de derivados clorados orgânicos no processo de desinfecção de água para abastecimento público. Resumo. In *Anais do XLIV Congresso Brasileiro de Química*. Fortaleza, CE. p 44.
- Maffei, D.F., Silveira, N.F.A. e Catanozi, M.P.L.M. (2013). Microbiological quality of organic and conventional vegetables sold in Brazil. *Food Control*, 29, 226-230.
- Mariano, A.M.S.E., Teixeira, A.N.S. e Okura, M.H. (2005). Eficiência de desinfecção para o tratamento “minimamente processado”. *FAZU*. 2, 68-78.
- Martins, E.A. e Quarentei, S.S. (2013). Sistema de gestão e padrões normativos aplicáveis ao segmento alimentício. In *Sistema de gestão – qualidade e segurança dos alimentos*. Germano, P.M.L. e Germano, M.I.S., eds. (São Paulo: Manole), pp 566-578.
- Martins, I.S., Faria, F.C., Miguel, M.A., Dias, M.P., Cardoso, F.L., Magalhães, A.C., Mascarenhas, L.A., Nouér, S.A., Barbosa, A.V., Vallim, D.C., Hofer, E., Rabello, R.F., Riley, L.W. e Moreira, B.M. (2010). A cluster of *Listeria monocytogenes* infectious in hospitalized adults. *American Journal of Infection Control*. 38, 31-36. ISSN 1527-3296.
- Medeiros, L.B. (2014). Avaliação da qualidade de microbiológica de hortaliças em relação ao tempo, temperatura e produtos saneantes. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 80 f.
- Monteiro, C.A., Levy, R.B., Claro, R.M., Castro, I.R. e Cannon, G. (2011). Increasing consumption of ultra-processed foods and likely impact on human health: evidence from Brazil. *Public Health Nutrition*. 14, 5-13.
- Nascimento, L.C., Lima, L.C.O., Valle, R.H.P., Veiga, S.M.O.M. e Fiorini, J.E. (2005). Uso de derivados clorados, ozônio e ultrassom na sanificação de água e alimentos: revisão. *Revista Higiene Alimentar*. 19, 48-57.
- Nascimento, M.S., Silva, N. e Catanozi, M.P.L.M. (2003). Avaliação microbiológica de frutas e hortaliças frescas, comercializadas no município de Campinas-SP. *Higiene Alimentar*. 17, 73-76.
- Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H. (2010). Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Internacional Journal of Food Microbiology*. 139, 13-5.
- Nou, X. e Luo, Y. (2010). Whole-Leaf Wash Improves Chlorine Efficacy for Microbial Reduction and Prevents Pathogen Cross-Contamination during Fresh-Cut Lettuce Processing. *Food Science*. 75, 283-290.
- Oliveira, A.B.A. (2005). Comparação de diferentes protocolos de higienização e Alface (*Lactuca sativa*) utilizados em restaurantes de Porto Alegre-RS. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 75 f.
- Oliveira, A.B.A., Ritter, A.C., Tondo, E.C. e Cardoso, M.I. (2012). Comparison of Different Washing and Disinfection Protocols Used by Food Services in Southern Brazil for Lettuce (*Lactuca sativa*). *Food Nutrition Science*. 3, 28-33.
- Oliveira, F.C.R. e Hoffmann, R. (2015). Consumo de alimentos orgânicos e de produtos light ou diet no Brasil: fatores condicionantes e elasticidades-renda. *Segurança Alimentar e Nutricional*. 22, 541-557.

Oliveira, K.A.M., Santana, E.C.M. e Silva, L.R. (2011). Avaliação das condições higiênicas sanitárias e do conhecimento das boas práticas em restaurantes *self-service* do município de Barra dos Garças-MT. *Revista Higiene Alimentar*. 25, 47-49.

Oliveira, M.N., Brasil, A.L.D. e Taddei, J.A.A.C. (2008). Avaliação das condições higiênicas-sanitárias das cozinhas de creches públicas e filantrópicas. *Ciência e Saúde Coletiva*. 13, 1051-1060.

Paiva, J.L. (2011). Avaliação microbiológica da alface (*Lactuca sativa*) em sistema de cultivo hidropônico e no solo, correlacionando os microrganismos isolados com os encontrados em toxinfecções alimentares em municípios da região Noroeste de São Paulo-SP. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 115 f.

Parish, M.E., Beuchat, L.R., Suslow, T.V., Harris, L.J., Garrett, E.H. e Farber, J.N. (2003). Methods to reduce or eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2, 161-173.

Parsons, D. (2006). Lechuga. *Área Producción Vegetal*. 3, 57-62.

Pereira, A.P.M., Werle, C.H., Gonçalves, T.M.V. e Hoffmann, F.L. (2011). Identificação e avaliação da resistência antimicrobiana de leveduras em vegetais minimamente processados. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 70, 139-43.

Pereira, E.L., Rodrigues, A. e Ramalhosa, E. (2013). Influence of working conditions and practices on fresh-cut lettuce salads quality. *Food Control*. 33, 406-412.

Philippi, S.T. (2003). *Nutrição e Técnica Dietética*. 1 ed. (São Paulo: Manole), pp 1020.

Pinheiro, A.B., Santos, D.M., Bukzem, A.L. e Vieira, J.A. (2011). Sanitização de frutas e hortaliças na indústria de alimentos. Resumo. In Anais do IX Seminário de Iniciação Científica, VI Jornada de Pesquisa e Pós-Graduação e Semana Nacional de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual de Goiás. Goiás, GO.

Disponível em:

http://www.prp2.ueg.br/sic2011/apresentacao/trabalhos/pdf/ciencias_exatas/sic/ce_sic_sanitizacao_de_frutas_e_hortalicas.pdf. Acesso em: 11/03/2019.

Porto, Ernani. (2006). Avaliação da Eficiência de Sanificantes e do Uso de Atmosferas Modificadas sobre *Listeria monocytogenes* Inoculada em Alfaves (*Lactuca sativa*). *Brazilian Journal Food Technology*. 9, 177-183.

Prado-Silva, L., Cadavez, V., Gonzales-Barron, U., Rezende, A.C.B. e Sant'Ana, A.S. (2015). Meta-analysis of the Effects of Sanitizing Treatments on *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* Inactivation in Fresh Produce. *Applied and Environmental Microbiology*. 81, 8008-8021.

Quintiliano, C.R., Santos, T.A., Paulino, T.S.T., Schattan, R.B. e Gollücke, A.P.B. (2008). Avaliação das condições higiênicas-sanitárias em restaurantes, com aplicação de ficha de inspeção baseada na legislação federal, RDC 216/2004. *Higiene Alimentar*. 22, 25-30.

Ribeiro, V.B. (2012). Expressão gênica e potencial de virulência de *Listeria monocytogenes* isolada de casos clínicos e alimentos submetidas a estresse osmótico. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 117 f.

Robin, C., LeBlanc, D.I., Rodríguez, F.P. e Delaquis, P. (2014). Comparative simulation of *Escherichia coli* O157:H7 behavior in package fresh-cut lettuce distributed in a typical Canadian supply chain in the summer and winter. *Food Control*. 35, 192-199.

Rodrigues, P. (2012). Hortaliças em revista: Cores e Sabores – A Importância nutricional das hortaliças. (Brasília: Embrapa Hortaliças), pp 16.

Saccol, A.L.F., Stangarlin, L., Richards, N.S. e Hecktheuer, L.H. (2009). Avaliação das boas práticas em duas visões: técnica e da empresa. *Brazilian Journal Food Technology*. 2, 19-23.

Sala, F.C. e Costa, C.P. (2012). Retrospectiva e tendência da alfalicultura brasileira. *Horticultura Brasileira*. 30, 187-194.

Sancho, R.A.S., Souza, J.D.R., de Lima, F.A. e Pastore, G. M. (2017). Evaluation of oligosaccharide profiles in selected cooked tubers and roots subjected to in vitro digestion. *LWT-Food Science and Technology*. 76, 270-277.

Santana, L.R.R., Carvalho, Rosemary D.S., Leite, C.C., Alcântara, L.M., Oliveira, T.W.S. e Rodrigues, B.M. (2006). Qualidade física, microbiológica e parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) de diferentes sistemas de cultivo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 26, 264-269.

Santos, C.M.G., Braga, C.L., Vieira, M.R.S., Cerqueira, R.C., Brauer, R.L. e Lima, G.P.P. (2010). Qualidade da alface comercializada no município de Botucatu-SP. *Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. 11, 67-74.

Santos, H.S., Muratori, M.C.S., Marques, A.L.A., Alves, V.C., Filho, F.C.C. e Costa, A.P.R. (2012). Avaliação da eficácia da água sanitária na sanitização de alfaces (*Lactuca sativa*). *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 71, 56-60.

São José, J.F.B. (2010). Cloro aliado ou vilão na sanitização de frutas e hortaliças. *Nutrição em Pauta*. 18, 53-56.

São Paulo (2011). Secretaria Municipal de Saúde. Portaria 2619 de 06 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento de Boas Práticas e de controle de condições sanitárias e técnicas das atividades relacionadas à importação, exportação, extração, produção, manipulação, beneficiamento, acondicionamento, transporte, armazenamento, distribuição, embalagem e reembalagem, fracionamento, comercialização e uso de alimentos – incluindo águas minerais, águas de fontes e bebidas -, aditivos e embalagens para alimentos. Disponível em: https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/chamadas/portaria_2619_1323696514.pdf. Acesso em: 22/02/2019.

Schattan, R.B. (2006). Conhecimento e percepção de risco sobre higiene alimentar em proprietários de restaurantes em duas regiões do município de Santos/SP. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Universidade Católica de Santos, São Paulo, 114 f.

Shinohara, N.K.S., Lima, T.B.N., Siqueira, L.P., Pereira, José, A.P. e Padilha, M.R.F. (2014). Avaliação da qualidade microbiológica de alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas em feiras livres e supermercados do Recife, Brasil. *Diálogos Acadêmicos*. 1, 102-112.

Silva, E.M.N.C.P., Ferreira, R.L.F., Araújo N.S.E., Tavella, L.B. e Solino, A.J.S. (2011). Qualidade de alface crespa cultivada em sistema orgânico, convencional e hidropônico. *Horticultura Brasileira*. 29, 242-245.

Silva, M.P., Cavalli, D.R. e Oliveira, T.C.R.M. (2006). Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 26, 352-359.

Silveira, A.C., Conesa, A., Aguayo, E. e Artes, F. (2008). Alternative Sanitizers to Chlorine for Use on Fresh-Cut “Galia” (*Cucumis melo* var. *catalupensis*) Melon. *Journal of Food Science*. 73, 405-411.

Simkhada, D., Kim, E., Lee, H.C. e Sohng, J.K. (2009). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the biological synthesis of 7-*O*-xylosyl naringenin. *Molecules and Cells*. 28, 397-401.

Soares, L.S. (2011). Segurança dos alimentos: avaliação do nível de conhecimento, atitudes e práticas dos manipuladores de alimentos na rede municipal de ensino de Camaçari-BA. Dissertação (Mestrado em Alimentos, Nutrição e Saúde) – Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 103 f.

Souza, E.R.N., Tebaldi, V.M.R. e Piccoli, R.H. (2015). Adaptação e adaptação cruzada de *Listeria monocytogenes* aos compostos eugenol e carvacrol. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 17, 528-533.

Souza, M.L., Bezerra, D.C.F. e Furtado, C.M. (2006). Avaliação higiênico sanitária de alfaces (*Lactuca sativa*) cultivadas pelos processos convencional e hidropônico e comercializadas em Rio Branco, AC. *Higiene Alimentar*. 20, 92-99.

Ssemanda, J.N., Reij, M., Muvunyi, C.M., Joosten, H. e Zwietering, M.H. (2017). Indicator microorganisms in fresh vegetables from “farm to fork” in Rwanda. *Food Control*. 75, 126-133.

Stangarlin, L.L.H., Hecktheuer, A.L., Serafim, e Saccol, A.L.F. (2013). Instrumentos de apoio para implantação das boas práticas em serviços de nutrição e dietética hospitalar. 1 ed. (Rio de Janeiro: Rubio), pp 13-97.

Stella, A.E. (2009). Fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de amostras de água, leite e fezes de bovinos leiteiros da região de ribeirão Preto-SP, Brasil. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 83 f.

Stertz, S.C., Pentead, P.T.P.S. e Freitas, R.J.S. (2004). Nitritos e nitratos em hortícolas produzidas pelos sistemas de cultivo convencional, orgânico e hidropônico na Região Metropolitana de Curitiba. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 63, 200-207.

Strasburg, J.V. (2016). Desenvolvimento de instrumentos para a avaliação de desempenho ambiental na produção de refeições. Tese (Doutorado em Qualidade Ambiental) – Universidade FEEVALE, Nova Hamburgo, 147 f.

Suinaga, F.A., Boiteux, L.S., Cabral, C.S. e Rodrigues, C. da S. (2013). Métodos de avaliação do florescimento precoce e identificação de fontes de tolerância ao calor em cultivares de alface do grupo varietal crespa. (Brasília: Embrapa Hortaliças), pp 4.

Suslow, T. (1997). Postharvest Chlorination: Basic Properties and Key Points for Effective Distribution. University of California. Division of Agriculture and Natural Resources. doi.org/10.3733/ucanr.8003.

Swaminaphan, B., Cabanes, D., Zhang, W. e Cossart, P. (2007). *Listeria monocytogenes*. In *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. Doyle, M.P. e Beuchat, L.R., eds. 3 ed. (Washington DC: ASM Press), pp 91-457.

Tancredi, R.C.P., Silva, Y. e Marin, V.A. (2006). Regulamentos Técnicos sobre condições higiênico-sanitárias, manual de boas práticas e POPs para indústrias/serviços de alimentação. (Rio de Janeiro: L.F. Livros), pp 45-48.

Tomich, R.G.P., Tomich, T.R., Amaral, C.A.A., Junqueira, R.G. e Pereira, A.J.G. (2005). Metodologia para avaliação das boas práticas de fabricação em indústrias de pão de queijo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 25, 115-120.

Tondo, E.C. e Bartz, S. (2011). Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos. 1 ed. (Porto Alegre: Sulina), pp 82-86.

- Veen, S.V.D., Hain, T., Wouters, J.A., Hossain, H., Vos, W.M., Abee, T., Chakraborty, T. e Wells-Bennik, M.H. (2007). The heat-shock response of *Listeria monocytogenes* comprises genes involved in heat shock, cell division, cell wall synthesis, and the SOS response. *Microbiology*. 153, 3593–3607.
- Veiros, M.B., Macedo, S.M., Santos, M.C.T., Proença, R.P.C., Rocha, A. e Kent-Smith, L. (2007). Proposta de check-list hígio-sanitária para unidades de restauração. *Alimentação Humana*. 13, 51-61.
- Veiros, M.B., Proença, R.P.C., Santos, M.C.T., Kent-Smith, L. e Rocha, A.N. (2009). Food safety practices in a Portuguese canteen. *Food Control* 2009. 20, 936-41.
- Vergara, C.M.A.C. e Albuquerque, M.B. (2010). Condições higiênico-sanitárias de restaurantes comerciais da cidade de Fortaleza-CE. *Revista Higiene Alimentar*. 25, 29-34.
- Wang, X.C., Chen, L., Ma, C.L., Yao, M.Z. e Yang, Y.J. (2010). Genotypic variation of beta-carotene and lutein contents in tea germplasms, *Comellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Journal of Food Composition and Analysis*. 23, 9-14.
- WHO (2003). World Health Organization. Fruit and Vegetable Promotion Initiative: a meeting report. Disponível em: https://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/f&v_promotion_initiative_report.pdf. Acesso em 10/02/2019.
- Zandonadi, R.P., Botelho, R.B.A., Sávio, K.E.O., Akutsu, R.C. e Araújo, W.M.C. (2007). Atitudes de risco do consumidor em restaurantes de autosserviço. *Revista de Nutrição*. 20, 19- 26.
- Zhang, L., Lu, Z., Yu, Z. e Gao, X. (2005). Preservation of fresh-cut celery by treatment of ozonated water. *Food Control*. 16, 279-283.