



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS MACAÉ
CURSO DE FARMÁCIA



Avaliação da eficácia do processo de higienização de hortaliças em restaurante do município de Macaé

CAMILLA RODRIGUES DA SILVA

Macaé
Julho de 2016

CAMILLA RODRIGUES DA SILVA

Avaliação da eficácia do processo de higienização de hortaliças em restaurante do município de Macaé

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé como um dos requisitos para obtenção do título de farmacêutico.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Analy M. de O. Leite

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Júlia Peralta Gonçalves

Macaé

Julho de 2016

“Tem dias que Deus caminha ao meu lado, eu vejo.

Tem dias que Ele me carrega no colo, eu sinto.”

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo à Deus pela oportunidade de ser uma pessoa melhor a cada dia. Por cada minuto de vida, manhã vivida e força para enfrentar as atribuições. Agradeço ao mestre Jesus por todos os ensinamentos deixados, seus conselhos e proteção.

À minha família. Minha mãe Erilda, que sempre me escutou nos momentos de aflição e de alegria, por ser minha base sólida e minha força quando pensei que não fosse mais capaz. Ao meu irmão Felipe, que do dia para a noite se tornou o homem da casa e cumpre o difícil trabalho de cuidar de 5 mulheres. Obrigada, meu amigo!

Às minhas sobrinhas, Ana Luíza e Alice que me trouxeram vida e felicidade. Um amor indescritível.

Aos meus amigos, que nunca estiveram ausentes. Principalmente aos meus amigos Alan Soares, Bruna Fernanda, Maria Gabriela, Thaíssa Ricci e Taís Clemente que sempre estiveram comigo em todos os momentos, fossem estes os mais felizes ou os mais tristes. Estas tiveram um papel essencial em toda a minha vida acadêmica, e agora fazem parte da minha família, literalmente.

À minha orientadora Analy M. de O. Leite, por toda paciência, risadas, tempo e ensinamentos oferecidos durante esta reta final da minha vida acadêmica.

À minha co-orientadora Júlia Peralta Gonçalves, que é a professora mais calma que tive. Obrigada por compartilhar sua paciência, calma e conhecimento comigo.

E por fim, gostaria de agradecer meu Pai Elisiário por sempre investir nos meus sonhos, por me proporcionar tantos momentos maravilhosos e por ter sido o melhor pai do mundo. Você se tornou minha estrela. Espero ansiosamente por nosso reencontro.

RESUMO

As hortaliças são frequentemente consumidas *in natura*, podendo veicular diferentes patógenos. Portanto, o cuidado na manipulação, armazenamento e aplicação das Boas Práticas de Fabricação são necessários. A higienização realizada no preparo da alface é uma etapa fundamental para a obtenção de alimentos seguros. Os objetivos desse estudo foram avaliar a eficácia de diferentes procedimentos de higienização de hortaliças, capacitar manipuladores de alimentos quanto as boas práticas de manipulação (BPM) e avaliar a qualidade das hortaliças servidas no Restaurante após a capacitação. Para a avaliação da eficácia da higienização, alfaces adquiridas em um supermercado de Macaé, e transportadas sob refrigeração até o laboratório do Polo Ajuda/UFRJ-Macaé, foram desfolhadas e submetidas aos tratamentos: T₀: controle, T₁: água, T₂: hipoclorito de sódio comercial e T₃: solução de vinagre (6,6%). Todos os tratamentos, com exceção do controle, foram lavados em água corrente e imersos nas respectivas soluções por 15 min. Para o ensaio parasitológico as amostras foram agitadas em solução salina por 15 min e processadas seguindo o método de Lutz. Na análise microbiológica, 25 g de cada tratamento foi homogeneizado em 225 ml de solução salina (0,85%), e diluições decimais seriadas foram realizadas, inoculando 0,1 ml nas placas para contagem. Foi realizada contagem de coliformes totais (CT) e *E. coli*, bactérias mesófilas aeróbias (BMA) e fungos filamentosos e leveduras (FFL), incubadas a 37°C/48h para bactérias e 25°C/7 dias para fungos. O material didático do curso foi elaborado sob forma de cartilhas e aulas teóricas e práticas, ambos baseados na legislação vigente. Após o curso, 16 amostras de hortaliças higienizadas e prontas para consumo foram submetidas a análises microbiológicas e parasitológicas, além da análise de coliformes termotolerantes em caldo EC (44,5°C/48h). Nos ensaios iniciais, os tratamentos de higienização promoveram uma redução das contagens, sendo o vinagre o mais efetivo para redução significativa de todos os microrganismos investigados, em relação ao controle. Colônias típicas de *E. coli* foram detectadas somente no T₀. Na contagem de BMA foi observado uma redução em todos os tratamentos em relação ao controle e redução significativa do vinagre em relação à água. Na contagem CT, a redução foi significativa somente para o T₃ em relação ao controle. Para a contagem total de FFL houve redução significativa nas amostras T₂ e T₃ em relação ao controle. No ensaio parasitológico, foram detectados cistos de *Entamoeba histolytica*, ovos de *Ascaris lumbricoides* e larvas de ancilostomídeos/*Strongyloides stercoralis* no T₀ e T₁ garantindo assim, a eficiência dos sanificantes utilizados. As hortaliças higienizadas e coletadas no restaurante apresentaram valores médios de BMA, CT e FFL de 5,6, 3,6 e 5,5 log(UFC/g), respectivamente. Destas, cinco apresentaram contagem de coliformes termotolerantes acima do estabelecido pela legislação vigente e foram consideradas impróprias para o consumo. Cinco amostras apresentaram ovos de *Ascaris lumbricoides*, dentre as quais, três em comum com os resultados insatisfatórios para padrão microbiológico

e uma em comum com uma amostra dentro do valor estabelecido pela legislação, configurando 6 amostras insatisfatórias (37,5%). Esses resultados evidenciaram a importância da implementação de BPM, com a adoção de Procedimento Operacional Padrão de higienização hortaliças proposto, para a obtenção de alimentos seguros para o consumo.

Palavras-chave: Análise de métodos de higienização, Higienização de hortaliças, Capacitação de manipuladores, Microbiologia, parasitologia, Acompanhamento das boas práticas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Produtos permitidos para desinfecção dos alimentos	19
Tabela 2	Número Mais Provável por grama ou mL, para séries de 3 tubos com inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 g ou mL e respectivos intervalos de confiança 95% (BRASIL, 2001).	27
Tabela 3	Análise microbiológica e parasitológica das hortaliças higienizadas coletadas no restaurante, após o curso, com sua condição higiênico-sanitária	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Contagem de fungos filamentosos e leveduras (log de UFC/g) dos quatro tratamentos avaliados	35
Figura 2	Contagem Bactérias mesófilas total (log de UFC/g) dos quatro tratamentos avaliados	37
Figura 3	Contagem de coliformes totais (log de UFC/g) dos quatro tratamentos avaliados	38
Figura 4	Contagem <i>E. coli</i> (log de UFC/g) dos quatro tratamentos avaliados	39
Figura 5	Fotos dos parasitas encontrados nas amostras antes do curso	40
Figura 6	Cartilha elaborada para os alunos do curso com instruções de como higienizar a alface	41
Figura 7	Fotos da aula prática e da aula teórica	43
Figura 8	Fotos dos parasitas encontrados nas amostras após o curso	49

Sumário

1 Introdução	11
1.1 Doenças transmitidas por alimentos (DTA)	12
1.1.1 Doenças de veiculação hídrica.....	13
1.1.2 Doenças parasitárias.....	14
1.1.2.1 Características das principais doenças causadas por parasitas em alimentos e água.....	15
1.2 Manipulador de alimentos e as Boas práticas	18
1.3 Métodos de higienização de alimentos	19
1.4 Microrganismos Indicadores.....	21
1.4.1 Coliformes totais, coliformes fecais e <i>Escherichia coli</i>	22
1.4.2 Coliformes totais.....	22
1.4.3 Coliformes fecais	23
1.4.4 <i>Escherichia coli</i>	23
1.4.5 Bactérias mesófilas aeróbias.....	24
1.4.6 Fungos filamentosos e leveduras.....	24
1.5 Análise Microbiológica.....	25
1.5.1 A técnica do número mais provável (NMP)	26
1.5.2 Método de contagem em placa	29
2 Justificativa.....	30
3 Objetivos	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4 Material e Métodos.....	32
4.1 Avaliação da eficácia de diferentes métodos de higienização de hortaliças	32
4.1.1 Preparo das amostras	32
4.1.2 Análise microbiológica das hortaliças.....	32
4.1.3 Análise parasitológica das hortaliças	33
4.1.4 Análise estatística	33
4.2 Capacitação dos Manipuladores de alimentos sobre Boas Práticas de Manipulação (BPM).....	34
4.5 Qualidade microbiológica e parasitológica de amostras de hortaliças higienizadas e servidas cruas no estabelecimento, após a capacitação dos manipuladores quanto as BPM.....	34
4.5.1 Coleta das amostras	34

4.5.2 Análise microbiológica.....	35
5 Resultados e Discussão	36
5.1 Avaliação da eficácia de diferentes métodos de higienização de hortaliças	36
5.2 Desenvolvimento de material educativo e a capacitação dos manipuladores.....	42
5.3 Qualidade microbiológica e parasitológica de amostras de hortaliças higienizadas e servidas cruas no estabelecimento após a capacitação	45
6 Considerações finais	51
6.1 Conclusão	51
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 Introdução

O consumo de hortaliças vem tornando-se maior nos últimos anos, o que se deve à crescente demanda por uma alimentação saudável; constituída por produtos naturais, com redução de aditivos químicos, ricos em fibras e de baixa caloria, como é o caso dos folhosos ou hortaliças.

A busca por uma alimentação mais saudável também visa diminuir o uso de alimentos com agrotóxicos, visto que a sua utilização é um dos recursos mais utilizados pelos agricultores para elevar a produtividade agrícola (OLIVEIRA et al., 2012).

Diante deste contexto, a agricultura brasileira está iniciando um novo ciclo de desenvolvimento. Em meio as mais variadas formas de cultivo de hortaliças, a orgânica se destaca, pois, utiliza a matéria orgânica para manter a fertilidade do solo. Segundo RESENDE et al. (2007) a idéia do cultivo orgânico, livre de agrotóxicos, ganhou força e apoio da mídia, conquistando a confiança da população que buscava uma alternativa saudável de alimentação aliada à crescente preocupação com a preservação do meio ambiente. A expectativa é que o país, finalmente seja inserido no mercado global, minimizando riscos ambientais, diminuindo as diferenças regionais, aumentando ganhos sociais e econômicos (SPADOTTO, 2005).

Assim sendo, a Associação Brasileira do comércio de sementes e mudas (ABCSEM) realizou o 2º levantamento de dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil e demonstrou que o total de cultivo de hortaliças seja de ordem de 656.730 mil hectares. Estima-se que as hortaliças gerem 2 milhões de empregos diretos, ou seja, 2,4 empregos/ha. Segundo estatísticas de 2012, a produção total de hortaliças no Brasil chega a 19,62 milhões por ano. A quantidade de mão de obra neste setor chega a 65.783.150 homens/dia (YEARBOOK, 2015).

Porém, as hortaliças também são fonte de grande preocupação pois podem ser responsáveis pela veiculação de microrganismos patogênicos, representando uma importante parcela dos alimentos envolvidos em casos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) (OLIVEIRA, 2005).

Por este motivo a correta higienização desse alimento é uma etapa considerada crítica e fundamental para garantir a segurança e qualidade microbiológica desses vegetais, consumidos *in natura*. Diante disso, o desenvolvimento de estudos que envolvem esta etapa crítica, além do aprimoramento de alguns protocolos existentes

são de grande importância para a saúde no Brasil, pois podem minimizar as causas de DTA (OLIVEIRA, 2005).

1.1 Doenças transmitidas por alimentos (DTA)

Um alimento pode causar doença, quando da existência de microrganismos patogênicos, que podem se proliferar e/ou produzir toxinas, levando a quadros clínicos de enfermidades por ambas situações.

Os alimentos também podem possuir substâncias químicas em sua composição ou podem também ser contaminados, acidentalmente, por alguma substância tóxica. Em alguns casos, estes podem ter sido contaminados por objetos estranhos que possam causar lesões ao consumidor (BAPTISTA & ANTUNES, 2005).

“Doenças transmitidas por alimentos (DTA) se trata de uma síndrome originada pela ingestão de alimentos e/ou de água que contenham agentes contaminantes (biológicos/microrganismos, toxinas ou outras substâncias químicas ou físicas) em quantidades tais que afetem a saúde do consumidor, em nível individual ou grupos de população”(BRASIL, 2014).

As doenças transmitidas pelos alimentos podem ser causadas por perigos de origem física, química e microbiológica. Aquelas veiculadas por microrganismos têm sido reconhecidas como um problema de saúde pública no mundo atual e uma causa significativa para a diminuição na produtividade e perdas econômicas que afetam os países, as empresas e os consumidores (MESQUITA et al., 2006)

O crescimento de casos das DTA se deve a vários motivos, dentre os quais podem ser destacados: grupos populacionais mais expostos ou vulneráveis, processo de urbanização descontrolado, crescente aumento das populações, necessidade de produção de alimentos em grandes quantidades e o deficiente controle dos órgãos públicos e privados, em relação à qualidade dos alimentos que são ofertados à população (BRASIL, 1994).

A grande quantidade de agentes causais e suas associações aos fatores citados anteriormente fazem com que as chances para a ocorrência das DTA aumente. Embora apenas uma pequena proporção seja notificada, as intoxicações e infecções podem se apresentar de formas crônica ou aguda, com características de surto ou de casos isolados (BRASIL, 1994).

Entre 1999 e 2008, foram notificados um total 6.062 surtos de DTA no Brasil. O ano com maior número de notificações foi 2005 (n=923), seguido de 2001 (n= 897) e

2002 (n=823). Entre 1999 e 2008, os surtos notificados de DTA acometeram 117.330 brasileiros, dos quais 64 foram a óbito. Nesse período, no ano de 2004, 21.723 pessoas adoeceram, seguido 17.981 em 2003, e 17.279 em 2005 (MARCHI et al., 2011).

Pesquisas recentes (Portal da Saúde, 2015) revelaram que no ano de 2015, aproximadamente 15.000 pessoas estavam envolvidas em casos de surtos no Brasil, onde ocorreram por volta de 420 surtos com uma taxa de letalidade de 0,07% no total. Destes dados, as hortaliças representam 1,2% na relação de distribuição de alimentos incriminados em surtos no Brasil (BRASIL, 2015). Geralmente, as verduras são adubadas com uma mistura de dejetos humanos e animais e irrigadas com água contaminada com material fecal.

1.1.1 Doenças de veiculação hídrica

A água é um valioso elemento promotor do desenvolvimento e do progresso, com diversas aplicações de importância econômica e social (CONEN, 2010). Entretanto, também pode transmitir doenças, que são conhecidas como doenças de veiculação hídrica (DVH). Estas são causadas principalmente por microrganismos patogênicos, de origem animal, frequentemente transmitidos pela rota fecal-oral, ou seja, eliminados nas fezes de indivíduos infectados e ingeridos na forma de água ou alimento infectado por água poluída com fezes (DO AMARAL et al., 2003).

As doenças de veiculação hídrica podem ocorrer por falta de água ou de rede de esgoto adequadas para deposição de dejetos, por práticas precárias de higiene, por ingestão da água contaminada, pelo contato da pele/mucosas com água contaminada e por insetos/vetores que se desenvolvem na água (TUCCI, 2002).

Dentre as doenças de veiculação hídrica destacam-se: protozooses, (como amebíase, giardíase e criptosporidíase), gastroenterites, febres tifoide e paratifoide, hepatite infecciosa, cólera, helmintíases como ascaridíase, teníase, ancilostomíase, dentre outros (SAÚDE, 2009).

1.1.2 Doenças parasitárias

Em países em desenvolvimento, a ocorrência de parasitoses intestinais atingem índices de até 90%. Muitas pesquisas já foram realizadas em várias regiões do Brasil sobre enteroparasitas presentes em hortaliças e os resultados mostram frequências bastante diferentes, dependendo das características das amostras em análise e das condições de saneamento dos locais (ESTEVES & FIGUEIRÔA, 2012).

As doenças parasitárias são uma forma de DTA e a transmissão das enteroparasitoses ocorre por via oral, por ingestão de alimentos ou água contaminados com estruturas parasitárias. Essas enfermidades são mais prevalentes em regiões onde as condições higiênico-sanitárias não são adequadas, com precário tratamento de esgoto e águas (DE MESQUITA et al., 2015). Estes fatores contribuem para a proliferação de ovos e larvas de helmintos e cistos de protozoários. Além disso a transmissão pessoa-a-pessoa é facilitada em ambientes fechados, aumentando o risco de infecções, uma vez que facilita a transmissão fecal-oral (ESTEVES & FIGUEIRÔA, 2012).

As hortaliças, principalmente as consumidas *in natura*, podem conter ovos e larvas de helmintos e cistos de protozoários, provenientes da água contaminada por dejetos fecais do homem e/ou de animais (ESTEVES & FIGUEIRÔA, 2012).

Como o hábito alimentar do brasileiro consiste em consumir hortaliças *in natura*, a exposição a transmissão por estes parasitas tem crescido em grande parte da população. Por este motivo, a constatação da presença de helmintos em hortaliças é de grande interesse para a Saúde Pública, uma vez que fornece dados para a vigilância sanitária sobre a higiene desses produtos, além de permitir o controle das condições em que foram cultivados (OLIVEIRA & GERMANO, 1992).

Entre as manifestações clínicas que são rotineiramente causadas por infecções por helmintos intestinais, estão a diarreia, *déficit* nutricional, obstrução intestinal, anemias e perda de peso. Também vale citar sintomatologia nas vias aéreas (Síndrome de Löeffler – afecção na qual há acúmulo de eosinófilos no tecido pulmonar), como quadro pneumônico com febre, tosse e eosinofilia, além de dispneia, manifestações alérgicas e bronquite em casos de helmintos que realizam o ciclo de Loss, que é quando os ovos eclodem no intestino e as larvas ganham a circulação sanguínea. Estas percorrem diversas partes do corpo para completar seu desenvolvimento. Neste ciclo, atingem o pulmão (ciclo pulmonar), podendo

caracterizar um quadro de doença pulmonar (PEREIRA & FERREIRA & KOIFMAN, 2008). As helmintíases transmitidas de forma passiva, cuja principal forma de transmissão é a ingestão de ovos a partir de água e alimentos contaminados, são mais graves quando a carga parasitária é maior e o hospedeiro tem menor idade. Em crianças, altas cargas parasitárias, acompanhadas de menor absorção de nutrientes e menor ingestão de alimentos, culminam com quadros de menor desenvolvimento físico e menor aproveitamento escolar. Já a sintomatologia frequentemente ocasionada por protozoários, inclui: colite disentérica ou não disentérica, cólicas, náuseas e vômitos, diarreias mucos sanguinolentas, em quadros graves de amebíase extra-intestinal, podem ocorrer o desenvolvimento do abscesso hepático e perfuração intestinal, que podem estar relacionados a casos fatais de infecção (DE MESQUITA et al., 2015).

As parasitoses que podem ser transmitidas pela água ou alimentos contaminados incluem a amebíase (*Entamoeba coli*), giardíase (*Giardia lamblia*), criptosporidíase (*Cryptosporidium parvum*), ascaridíase (*Ascaris lumbricoides*), oxiuriase (*Enterobius vermiculares*), tricuriase (*Trichuris trichiura*), ancilostomíase, estrogiloidíase e cisticercose (COSAPA, 2011).

1.1.2.1 Características das principais doenças causadas por parasitos transmitidos por alimentos e água contaminados

Existem diversos protozoários e outros organismos que são de grande importância para a saúde humana. Seus principais modos de transmissão incluem a ingestão de água e alimentos que estejam contaminados, assim como a transmissão fecal-oral pelo contato pessoa a pessoa (FORSYTHE, 2013).

O nematoide *Trichinella spiralis* possui como hospedeiro intermediário suínos. Causa a doença chamada de triquinose cujos sintomas mais comuns são gastro-intestinais. No período de migração das larvas, pode ocorrer febre, dores musculares e fraqueza geral. Sua transmissão para o homem se dá através da ingestão da carne de suínos crua ou mal cozida (BAPTISTA & ANTUNES, 2005).

O protozoário *Toxoplasma gondii* possui como hospedeiro definitivo gatos e causa a doença conhecida como toxoplasmose. Em indivíduos imunocompetentes, a infecção normalmente é assintomática, podendo apresentar sintomas como febre,

fadiga, cefaleia, dores musculares e de articulações. Pode afetar a visão em indivíduos adultos que se infectaram ainda na infância, e afetar gravemente fetos de mães que se infectaram ainda na gravidez. Os alimentos associados com a transmissão do *T. gondii* são a carne de suínos, bovinos, ovinos ou de outros animais infectados, consumidas cruas ou mal cozidas, além da contaminação de água e alimentos crus com oocistos provenientes de fezes de gatos (BAPTISTA & ANTUNES, 2005).

Muitas espécies do protozoário do gênero *Cryptosporidium* possuem como hospedeiros bovinos, caprinos, ovinos e outros animais. A espécie *Cryptosporidium parvum* está relacionada com a doença no homem e causa a doença criptosporidiose que normalmente é assintomática em indivíduos imunocompetentes. Em indivíduos imunodeprimidos, apresenta sintomas como diarreia crônica e aquosa, acompanhada de desidratação, perda de peso, febre baixa persistente e dor abdominal. O principal mecanismo de transmissão de *C. parvum* é através da ingestão de alimentos contaminados com oocistos provenientes de manipuladores contaminados (BAPTISTA & ANTUNES, 2005).

O protozoário *Giardia lamblia* possui cães, gatos, bovinos, ovinos e uma variedade de animais silvestres como hospedeiros, sendo o homem também hospedeiro deste protozoário. Causa a doença chamada giardíase que tem como principal sintoma a diarreia, que leva à desnutrição em casos crônicos. É um dos parasitos intestinais humano mais comuns em todo o mundo, sendo encontrado geralmente na água e alimentos contaminados por cistos (FORSYTHE, 2013).

Ascaris lumbricoides é um parasito que possui o homem como único hospedeiro. Causa a doença chamada ascaridiose, que é assintomática na maioria dos casos, mas pode apresentar sintomas como desconforto abdominal, flatulência, cólica, diarreia. Nas crianças, infecções com grande carga parasitária podem causar obstrução ou semi obstrução intestinal, o que pode, inclusive, levar a morte. Seus ovos se desenvolvem em água ou em terra úmida, tornando-os infectantes pouco tempo após eu contato com estas regiões. Sua infecção nos seres humanos se dá quando estes ingerem alimentos e água contaminados ou quando as crianças, após contato com o solo contaminado, levam as mãos à boca (BAPTISTA & ANTUNES, 2005).

A *Entamoeba histolytica* é um protozoário que possui como hospedeiro o homem. Causa a amebíase em que a maioria dos pacientes contaminados não apresentam sintomas. Quando há doença sintomática, ela geralmente surge entre 1 a 4

semanas após a contaminação pelos cistos do parasita. Nos 10% dos pacientes que são sintomáticos, dor abdominal, tenesmo, diarreia aquosa e volumosa, com várias evacuações por dia, e perda de peso são mais comuns. Sua infecção se dá pela ingestão de água ou alimentos (frutas e verduras) contaminados por cistos de amebas (BAPTISTA & ANTUNES, 2005).

Taenia saginata e *Taenia solium* são helmintos transmitidos ao homem pela ingestão de carne bovina (*T. saginata*) ou suína (*T. solium*), cruas ou mal cozidas, que contenham cisticercos. Possuem como único hospedeiro definitivo o homem. A doença causada após a ingestão de cisticercos é a teníase. Muitas vezes é assintomática. Porém podem surgir sintomas como insônia, anorexia, perda de peso e dores abdominais (FORSYTHE, 2013). Já a doença causada depois da ingestão de ovos viáveis da *taenia* é a cisticercose. Quando estes ovos chegam ao estômago e liberam o embrião que atravessa a mucosa gástrica, vai para a corrente sanguínea e se distribui pelo corpo, pode alcançar diversos tecidos (músculos, coração, olhos e cérebro) aonde irá se desenvolver o cisticerco (larva). Ao atingir o cérebro causam a Neurocisticercose, que é a forma mais grave da infecção. A cisticercose também pode ser assintomática em alguns indivíduos ou apresentar sintomas como cefaleia, convulsões, hipertensão craniana, entre outros (COSAPA, 2011).

A estrogiloidíase é uma doença causada pelo helminto *Strongyloides stercoralis*. Tem como hospedeiro definitivo o homem. Este helminto intestinal infecta os seres humanos através do contato com o solo que contém as larvas. A infecção pelo *Strongyloides stercoralis* é frequentemente leve ou assintomática. Quando sintomática possui como sintomas lesões cutâneas, lesões pulmonares, anemia, diarreia, emagrecimento, desidratação e irritabilidade (BAPTISTA & ANTUNES, 2005).

A família Ancylostomatidae inclui nematoides parasitos cuja infecção desencadeia um processo patológico crônico, mas que em alguns casos pode resultar até em morte. A doença causada chama-se ancilostomose ou ancilostomíase ou amarelão. Os agentes etiológicos das ancilostomoses humanas são *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* e *Ancylostoma ceylanicum*, sendo este último menos comum em humanos. A infecção normalmente se dá pela penetração das larvas na pele, e, no caso de *A. duodenale*, pela ingestão de água e alimentos contaminados por ovos ou larvas. A manifestação clínica mais grave na ancilostomose é a anemia ferropriva, decorrente da espoliação sanguínea causada

pelos helmintos adultos na mucosa intestinal. Pessoas saudáveis e com alimentação rica em ferro podem não perceber os sintomas (BAPTISTA & ANTUNES, 2005).

1.2 Manipulador de alimentos e as Boas práticas

Segundo Garcia (2007), a obtenção de um alimento seguro se dá através adoção de cuidados higiênico- sanitários em todas as etapas do seu processamento, desde a produção primária até o consumo. Para se obter um alimento seguro, deve-se seguir um programa de Boas Práticas para manipuladores de alimentos (GARCIA, 2007).

“As Boas Práticas representam um conjunto de princípios e regras para o correto manuseio de alimentos, que abrange desde as matérias-primas até o produto final, garantindo assim a integridade dos alimentos e a saúde do consumidor” (GARCIA, 2007).

Manipulador de alimentos é a classificação dada para todas as pessoas que entram em contato com parte ou com toda a produção de alimentos, dentre os quais, aqueles que colhem, abatem, armazenam, transportam, processam, ou os preparam, abrangendo desde os trabalhadores de indústrias até as donas de casa (GERMANO et al.,2000).

Os manipuladores podem estar associados à veiculação de microrganismos deterioradores, patogênicos e de origem fecal. Por exemplo, mãos, ferimentos, boca, nariz, pele, e cabelo do manipulador podem servir como fonte de várias contaminações. Isto pode ocorrer quando estes não executam sua higiene pessoal adequadamente e/ou quando realizam suas atividades sem os corretos cuidados relacionados com as boas práticas de fabricação (CRISTINA et. al, 2013).

Segundo a Legislações Brasileira RDC nº 216, de 15 de setembro de 2005 da ANVISA, alguns procedimentos de Boas Práticas para Serviços de Alimentação são obrigatórios para assegurar que o alimento recebido pelo consumidor seja saudável, seguro e apresente a qualidade especificada na lei. Esta resolução dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação, e estabelece que devem ser aplicadas Boas Práticas para serviços de alimentação a fim de garantir as condições higiênico - sanitárias do alimento preparado em todos os serviços de alimentação que realizam algumas das atividades de: manipulação, preparação, fracionamento, armazenamento, distribuição, transporte, exposição à venda e entrega

de alimentos preparados ao consumo, pois o contato com alimentos nestes locais é muito grande, aumentando a chance de contaminação (BRASIL, 2004).

A legislação impõe responsabilidades ao manipulador das hortaliças e alimentos em geral. Esta estabelece que o responsável pelas atividades de manipulação dos alimentos deve ser comprovadamente submetido a curso de capacitação, abordando, no mínimo, os seguintes temas: Contaminantes alimentares; Doenças transmitidas por alimentos; Manipulação higiênica dos alimentos e Boas Práticas (BRASIL, 2004).

1.3 Métodos de higienização de alimentos

A portaria nº 18 de 2008 do Centro de Vigilância Sanitária (CVS) da Secretaria de Estado da Saúde da ANVISA, regulamenta os parâmetros e critérios para o controle higiênico-sanitário em estabelecimentos de alimentos. A pré-lavagem de hortifruti, quando existente, deve ser feita em água potável e em local apropriado. Para o preparo destes gêneros, deve ser realizada a higienização completa que compreende: lavagem criteriosa com água potável, desinfecção com a imersão do hortifruti em produtos permitidos para desinfecção dos alimentos (Tabela 1) por 15 a 30 minutos e enxágue com água potável (BRASIL, 2008).

Tabela 1 - Produtos permitidos para desinfecção dos alimentos.

Princípio ativo	Concentração
Hipoclorito de sódio a 2,0 – 2,5%	100 a 250 ppm
Hipoclorito de sódio a 1%	100 a 250 ppm
Cloro orgânico	100 a 250 ppm

A higiene dos alimentos é toda condição e medida necessária para garantir a segurança e a adequação dos alimentos em todas as etapas da cadeia de alimentos (BRASIL, 2008).

A higienização de vegetais e os aspectos de higiene pessoal podem ser considerados etapas críticas do processamento e manipulação do produto, sob o ponto de vista da segurança alimentar (SAPERS, 2001). Por este motivo, é necessário a realização de métodos eficientes para desinfecção de produtos frescos, que podem conter patógenos, como bactérias, protozoários, helmintos e fungos (SAPERS, 2001).

Um grande número de agentes de lavagem e desinfecção têm sido aprovados para a higienização de frutas e legumes. Alguns já foram avaliados em investigações em escala laboratorial. Estes estudos geralmente aplicam tais tratamentos pelo método de imersão do alimento artificialmente contaminado numa solução aquosa, contendo o agente de sanificação a ser testado durante um tempo prescrito. Os resultados de tais estudos variam amplamente, dependendo do método de inoculação da amostra, a escolha do organismo de teste, o intervalo de tempo entre a inoculação e o tratamento, as condições de tratamento (temperatura, grau de agitação), e o método de recuperação (SAPERS, 2001).

Durante a higienização, a lavagem em água corrente de boa qualidade pode reduzir em até 90% a carga microbiana dos vegetais (FRANK & TAKEUSHI, 1999). Entretanto, esse tratamento ainda não é suficiente para que a carga microbiana seja mantida em níveis seguros, sendo fundamental a aplicação de uma etapa de sanitização. Portanto, procedimentos seguros do ponto de vista toxicológico e microbiológico devem ser utilizados (SAPERS, 2001).

Agentes como ácido peracético, ácido acético (vinagre), hipoclorito de sódio, entre outros, geralmente são utilizados por serem considerados eficazes na sanitização de hortaliças e frutas. Dentre os mais utilizados estão os compostos clorados, como o hipoclorito de sódio (água sanitária), devido ao seu baixo custo e eficácia. Porém, outro produto que pode ser utilizado é o vinagre, embora não seja tão bem aceito, uma vez que tradicionalmente está associado ao uso como um condimento (FONTANA, 2006).

O hipoclorito de sódio (água sanitária) é um sanitizante químico frequentemente utilizado por ser de fácil aplicação, rápida ação e possuir completa dissociação em água. Geralmente é utilizado no intervalo de concentração de 50 a 200 ppm com um intervalo de contato de 10 a 15 minutos, para a sanificação de alimentos (PARISH et al., 2003).

No entanto, outros agentes como o ácido acético, ácido peracético e vinagre começaram a despertar interesse das empresas, pois existem dúvidas quanto à toxicidade do cloro nos alimentos (NASCIMENTO, 2003). Além de possuir efeito limitado sobre determinados microrganismos, pode produzir substâncias comprovadamente carcinogênicas, nomeadas trihalometanos (TADEU, 2007).

O vinagre (ácido acético) apesar de ser classificado como um condimento, também é utilizado como sanitizante. É considerado um esporicida que permanece efetivo em baixas temperaturas, e um biocida efetivo, sem produção de resíduo tóxico. Devido ao seu grande potencial bactericida, é frequentemente utilizado no tratamento de hortaliças, pois é um produto barato e está disponível nos domicílios e restaurantes (NASCIMENTO, 2005).

1.4 Microrganismos Indicadores

Os microrganismos indicadores são grupos ou espécies de microrganismos que, quando encontrados em alimentos, fornecem informações sobre a possível ocorrência de contaminação de origem fecal, possível presença de patógenos ou ainda sobre a possível deterioração do alimento. Estes também podem indicar contaminação sanitária inadequada durante o processamento, produção ou armazenamento (FRANCO & LANDGRAF, 1996). Microrganismos indicadores em geral são mais comumente utilizados para avaliar a higiene e segurança dos alimentos do que a qualidade em si (FORSYTHE, 2013).

Como exemplos de microrganismos indicadores podemos citar aqueles que, segundo a International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), podem ser agrupados em: a) Microrganismos que não oferecem um risco direto à saúde: contagem padrão de mesófilos, contagem de psicrotóxicos e termófilos, contagem de bolores e leveduras; b) Microrganismos que oferecem um risco baixo ou indireto à saúde: coliformes totais, coliformes fecais, enterococos, enterobactérias totais, *Escherichia coli* (ALMEIDA, 2006). É importante que um indicador de segurança alimentar apresente algumas características, como: ser detectável de forma rápida e fácil; estar ausente de alimentos livres de patógenos, com exceção de números mínimos; estar presente quando outros patógenos de interesse estiverem presentes, ser facilmente distinguível de outros membros da microbiota do alimento e possuir características e taxas de crescimento equivalentes às do patógeno (FORSYTHE, 2013).

1.4.1 Coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli*

O termo Coliforme é utilizado genericamente para as bactérias Gram-negativas, anaeróbias, facultativas e em forma de bastonetes. Tais microrganismos há décadas foram utilizados como indicadores, que mediam o nível de contaminação fecal e a presença de patógenos entéricos na água doce (FORSYTHE, 2013).

Microrganismos indicadores de contaminação fecal são considerados a forma mais sensível e específica de avaliar a qualidade higiênica de água. As bactérias indicadoras de contaminação fecal devem cumprir determinados critérios para conferir resultados significativos. Devem estar presentes em números elevados nas fezes de seres humanos e em animais de sangue quente, além de serem prontamente detectáveis por métodos simples, e não crescerem na água natural. Os principais organismos indicadores de contaminação fecal são *Escherichia coli*, coliformes termotolerantes e outras bactérias coliformes (WHO, 1996).

Os coliformes podem ser destruídos facilmente pelo calor do processamento, por este motivo, são úteis em testes de contaminação pós-processamento (FORSYTHE, 2013).

Embora o grupo coliformes esteja comumente presente no solo, linhagens de *E. coli* não fazem parte da microbiota normal de produtos cultivados em solo sem contaminação fecal, com água de boa qualidade e boas práticas de manipulação. Portanto, esta espécie é indicadora da qualidade higiênico-sanitária dos processos e, geralmente, quando encontrada em altos índices, indica um risco de veiculação de outros patógenos (NASCIMENTO, 2003).

1.4.2 Coliformes totais

De acordo com Franco e Landgraf (1996), coliformes totais é um grupo composto por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubados a 35-37 °C, por 48 horas. São bacilos Gram-negativos não formadores de esporos.

Pertencem a este grupo os gêneros bacterianos *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter*, incluindo algumas espécies, dentre as quais encontram-se bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos, como também diversos

gêneros e espécies de bactérias não entéricas. Por isso, sua enumeração em água e alimentos é menos representativa, como indicação de contaminação fecal, do que a enumeração de coliformes fecais ou *E. coli* (SILVA et. al, 2007).

1.4.3 Coliformes fecais ou termotolerantes

A denominação “coliformes a 45°C” é equivalente a “coliformes fecais ou termotolerantes” e compreendem o gênero *Escherichia* e, em menor grau, espécies de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e outros (BRASIL, 2001). Os coliformes termotolerantes são definidos como o grupo de organismos coliformes que são capazes de fermentar a lactose em 44-45 °C.

Quando esta análise é efetuada, busca-se a determinação de coliformes de origem gastrintestinal. Porém, sabe-se que cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* incluídas neste grupo podem apresentar origem não fecal, como água, solo e vegetais (BRASIL, 2001).

1.4.4 *Escherichia coli*

A *E. coli* foi isolada primeiramente em 1885, por Theodor Von Escherich, médico austríaco no final do século XIX, em amostras fecais coletadas de crianças com diarreia. Em 1892, Shardingger propôs que este microrganismo poderia ser utilizado como indicador de contaminação fecal. Estudos realizados posteriormente demonstraram que este microrganismo poderia ser encontrado e isolado em amostras fecais diarreicas ou não. Diante destes estudos, a *E. coli* passou a ser considerada participante da microbiota entérica normal do homem e dos animais de sangue quente (TAVARES, 2011).

Dentre as bactérias de habitat reconhecidamente fecal, dentro do grupo dos coliformes fecais, a *E. coli* é a mais conhecida e a mais facilmente diferenciada dos membros não fecais. Todos os demais membros do grupo têm uma associação duvidosa com a contaminação fecal. *E. coli*, embora também possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais, é o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o momento (SILVA, 2002). Segundo WHO (1996), *E. coli* é o

indicador de primeira escolha quando os recursos para exames microbiológicos são limitados.

Em alimentos vegetais frescos, o único indicador válido de contaminação fecal é a *E. coli*, uma vez que os demais indicadores são encontrados naturalmente neste tipo de alimento (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

A *E. coli*, abundante em fezes humanas e animais, pode ser encontrada em esgoto, águas de reuso, efluentes tratados e em todas as águas naturais e solos que estão sujeitas a contaminação fecal recente, oriundo de seres humanos, agricultura, animais selvagens e pássaros (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

De modo geral, essa bactéria é considerada um comensal inofensivo, no entanto, diversos sorotipos dessa espécie apresentam potencial patogênico (TAVARES, 2011). Este microrganismo apresenta uma diversidade patogênica extraordinária compreendendo numerosos grupos e sorotipos, sendo capaz de causar infecções intestinais e extra-intestinais por diferentes mecanismos, assim como infecção do trato urinário e meningites (TAVARES, 2011).

1.4.5 Bactérias mesófilas aeróbias

A contagem de bactérias mesófilas aeróbias totais é um indicador microbiológico de qualidade de alimentos comumente utilizado. Esta contagem indica se a limpeza, a desinfecção e o controle da temperatura durante os processos de tratamento industrial, transporte e armazenamento foram realizados de forma adequada. Sua determinação permite obter informação sobre a alteração incipiente dos alimentos, sua provável vida útil, a falta de controle no descongelamento dos alimentos ou desvios na temperatura de refrigeração estabelecida (SILVA, 2002).

1.4.6 Fungos filamentosos e leveduras

A elevada contagem de fungos filamentosos e leveduras pode indicar condições higiênicas deficientes de equipamentos, falhas no processamento e/ou estocagem e matéria-prima com contaminação excessiva. A presença em grande quantidade pode acarretar em alterações nos produtos embalados, como a fermentação, que altera o sabor e o aroma característicos (NASCIMENTO, 2003).

Algumas leveduras fazem parte da microbiota natural de frutas e têm sido detectadas com frequência em vegetais (NASCIMENTO, 2003). De modo geral, requerem menos umidade que a maior parte das bactérias e mais umidade que a maioria dos fungos filamentosos. A temperatura ideal para seu crescimento varia entre 25-30 °C. O crescimento é favorecido em pH ácido (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Os fungos filamentosos são compostos por hifas, segmentadas ou não, cujo conjunto se chama micélio. Nas hifas encontram-se as estruturas produtoras de esporos, responsáveis pela reprodução deste grupo de organismos. A presença destes microrganismos no alimento pode tornar-se um perigo à saúde pública devido à produção de micotoxinas (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

1.5 Análise Microbiológica

A análise microbiológica de alimentos normalmente é realizada para verificar quantos e quais microrganismos estão presentes, a fim de se conhecer as condições de higiene em que o alimento foi preparado, os riscos que o mesmo pode oferecer à saúde do consumidor e se alcançará ou não a vida útil pretendida. Essa análise é indispensável também para verificar se os padrões e especificações microbiológicas para alimentos, nacionais ou internacionais, estão sendo atendidos adequadamente (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Alimentos contaminados, geralmente encontram-se em condições aparentemente normais, com odor e sabor em bom estado à impressão do consumidor, que normalmente não toma ciência dos perigos envolvidos, não identificando o alimento que poderia estar contaminado, em suas últimas refeições. Deste modo, isso dificulta o rastreamento por alimentos responsáveis por toxinfecções (FORSYTHE, 2002).

O alimento tem sua qualidade delimitada através do controle realizado por meio da Inspeção, durante sua produção até a execução de testes físico-químicos, microbiológicos e químicos do produto final. Um parâmetro existente para a determinação da qualidade microbiológica de alimentos se dá pela condição higiênico-sanitária (LIMA, 2007).

A aprovação ou rejeição de qualquer alimento submetido a análise está na dependência dos resultados e dos critérios microbiológicos adotados (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Os critérios microbiológicos podem ser obrigatórios ou de

orientação. Um critério obrigatório é aquele que não pode ser desobedecido em nenhuma situação. Os alimentos que não estiverem de acordo com esse critério devem ser reprovados (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

No contexto exposto, padrão microbiológico é um critério obrigatório, pois faz parte de uma lei ou de uma regulamentação administrativa. O não atendimento ao padrão microbiológico vigente constitui violação da lei, e medidas legais por parte dos órgãos competentes são possíveis (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

No Brasil, a Resolução RDC nº 12, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA), de 2 de Janeiro de 2001 estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos destinados ao consumo humano (BRASIL, 2001).

Métodos e variações de diferentes métodos que são utilizados para detecção quantitativa e qualitativa de microrganismos em alimentos, estão relatados em diversos estudos. No entanto, é aconselhável que se utilize métodos que tenham sido aprovados por órgãos reguladores. Estes podem ser métodos padrões ou recomendados. Nos últimos anos, esses métodos são divididos em métodos convencionais e métodos rápidos (SILVA, 2002).

1.5.1 A técnica do número mais provável (NMP)

A técnica do Número Mais Provável (NMP) permite calcular a quantidade de um microrganismo específico em uma amostra de água, utilizando tabelas de probabilidade. As diluições decimais obtidas são inoculadas em séries de tubos contendo meio líquido seletivo. Os tubos são considerados positivos quando ocorre a identificação de crescimento e produção de gás de fermentação. A densidade bacteriana é determinada pela combinação de resultados positivos e negativos em uma tabela conhecida como tabela NMP. Este método é constituído por três testes, dentre os quais: o teste presuntivo, teste confirmativo e teste completo (VERÍSSIMO & MORAIS, 2006).

Estes testes são divididos em etapas, a primeira etapa é o teste presuntivo que fornece uma estimativa preliminar da densidade do grupo bacteriano baseada no enriquecimento em meio minimamente restritivo. Os resultados deste teste não podem ser usados sem confirmação posterior. A segunda etapa consiste no teste confirmativo, onde os tubos que são considerados positivos no teste anterior são

inoculados em tubos de meio mais seletivo e inibidor. As reações positivas são lidas e a densidade calculada com a ajuda da tabela NMP. O Teste Completo é a terceira etapa e consiste na identificação bioquímica da espécie microbiana investigada.

Esta técnica tem por base a probabilidade estatística relacionada com a frequência da ocorrência de resultados positivos mais prováveis em função do número real de microrganismos presentes. (VERÍSSIMO & MORAIS, 2006; BRASIL, 2003).

A Instrução normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003) fornece uma tabela para a consulta do NMP correspondente à combinação de tubos positivos, com inoculação de somente três diluições seriadas como mostra a tabela 2.

Tabela 2: Número Mais Provável por grama ou mL, para séries de 3 tubos com inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 g ou mL e respectivos intervalos de confiança 95% (BRASIL, 2001).

Número de Tubos Positivos			NMP/g ou mL	Intervalo Confiança (95%)	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
0	0	0	<3,0	-.-	9,5
0	0	1	3,0	0,15	9,6
0	1	0	3,0	0,15	11
0	1	1	6,1	1,2	18
0	2	0	6,2	1,2	18
0	3	0	9,4	3,6	38
1	0	0	3,6	0,17	18
1	0	1	7,2	1,3	18
1	0	2	11	3,6	38
1	1	0	7,4	1,3	20
1	1	1	11	3,6	38
1	2	0	11	3,6	42
1	2	1	15	4,5	42
1	3	0	16	4,5	42
2	0	0	9,2	1,4	38
2	0	1	14	3,6	42
2	0	2	20	4,5	42
2	1	0	15	3,7	42

2	1	1	20	4,5	42
2	1	2	27	8,7	94
2	2	0	21	4,5	42
2	2	1	28	8,7	94
2	2	2	35	8,7	94
2	3	0	29	8,7	94
2	3	1	36	8,7	94
3	0	0	23	4,6	94
3	0	1	38	8,7	110
3	0	2	64	17	180
3	1	0	43	9	180
3	1	1	75	17	200
3	1	2	120	37	420
3	1	3	160	40	420
3	2	0	93	18	420
3	2	1	150	37	420
3	2	2	210	40	430
3	2	3	290	90	1000
3	3	0	240	42	1000
3	3	1	460	90	2000
3	3	2	1100	180	4100
3	3	3	>1100	420	.-

1.5.2 Método de contagem em placa

O método de contagem de microrganismos em placas consiste em um método geral, podendo ser utilizado na contagem de grandes grupos microbianos, como aeróbios, mesófilos, psicrófilos, termófilos, fungos filamentosos e leveduras, variando o tipo de meio, a temperatura e o tempo de incubação (ALMEIDA, 2006).

A partir deste método, as amostras de alimentos são homogeneizadas, diluídas em séries em diluente apropriado e, posteriormente plaqueadas com ou sobre um meio de ágar apropriado e incubadas. Após o período de incubação, placas contendo de 30-300 UFC são selecionadas e todas as colônias visíveis contadas. Este método é baseado no princípio de que cada célula que se encontre presente em uma amostra irá formar uma colônia separada e visível, quando fixada com meio que lhe forneça condições ideais para seu crescimento (SILVA, 2002).

2 Justificativa

Frutas e hortaliças são veiculadores de microrganismos e podem estar associados a doenças transmitidas por alimentos (DTA). Inúmeras são as causas para a presença de elevada carga microbiana nesse tipo de produto entre as quais estão as técnicas de cultivo, armazenamento, transporte e distribuição para consumo, a prática do uso de adubo orgânico, a utilização de águas contaminadas para irrigação, o transporte feito em engradados abertos e as condições de higiene no manuseio e preparo das refeições, principalmente quando tais alimentos são consumidos *in natura* (MARIA; ADOLFO; PINTO, 2004).

Macaé é um município do estado do Rio de Janeiro, situado na área nordeste da capital do estado. Esta é a quarta cidade do estado em qualidade de vida, de acordo com o Índice de Desenvolvimento Municipal (IFDM), elaborado pela Firjan em 2011, com base nos dados de 2009. O município está na seleta lista das 167 cidades do país - 10% do total – que obteve nota acima de 0,8 no índice, que corresponde a cidades com alto desenvolvimento (MACAÉ, 2010). A cidade conta com uma população de 206.748 pessoas, segundo dados de 2010 e um PIB per capita de R\$ 42 mil (MACAÉ, 2010).

No entanto, possui três estações de tratamento de esgoto em funcionamento, que atendem a cerca de 50% da população, não sendo suficientes para atender a toda população do município (MACAÉ, 2010). Há vários pontos em que a água ainda não é tratada. Desta forma, a água de irrigação pode não se apresentar em condições adequadas para uso e para manter as boas práticas agrícolas, representando um risco para produção de hortaliças. A água exerce um papel importante no cultivo de hortaliças, pois pode veicular patógenos, caracterizando quadros de doenças de veiculação hídrica.

Desta forma, a introdução da capacitação dos manipuladores e a adoção das boas práticas por parte dos mesmos em restaurantes do município é fundamental, pois, o momento do preparo e higienização destes produtos é uma etapa crítica e imprescindível para obtenção do alimento seguro para o consumidor.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Melhorar a qualidade das hortaliças servidas em restaurante situado no município de Macaé através da capacitação dos manipuladores de alimentos quanto as Boas Práticas de Manipulação e a busca pela educação continuada para a produção de alimentos seguros e monitoramento das práticas adotadas por meio de análises microbiológicas e parasitológicas das hortaliças servidas neste estabelecimento.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a eficácia de métodos de higienização de hortaliças, frequentemente utilizados em serviços de alimentação, em relação aos aspectos microbiológicos e parasitológicos.
- Promover curso de capacitação aos Manipuladores de Alimentos sobre as Boas Práticas de Manipulação, de acordo com as exigências da RDC 216/2004.
- Monitorar e avaliar a qualidade microbiológica e parasitológica desses alimentos servidos no estabelecimento após a capacitação.

4 Material e Métodos

4.1 Avaliação da eficácia de diferentes métodos de higienização de hortaliças

A eficácia da aplicação de diferentes sanitizantes para higienização de hortaliças foi realizada em condições controladas no laboratório do pólo Ajuda/Campus UFRJ-Macaé, a fim de utilizar os resultados obtidos como subsídios para o curso de capacitação.

4.1.1 Preparo das amostras

As amostras de alface foram adquiridas em um supermercado situado na cidade de Macaé. Foram pesados quatro lotes de 50g e higienizados individualmente, onde: T₀ – Controle; T₁ – água; T₂ – Hipoclorito de sódio e T₃ – Vinagre. Para todos os tratamentos, com exceção do tratamento controle (T₀), as alfaces foram desfolhadas e lavadas em água corrente. Amostras do tratamento T₁ foram imersas em solução com 1L de água e deixado em imersão por 15 minutos; T₂ foi higienizado com 1L de água contendo 20 gotas de solução comercial de hipoclorito de sódio (200 ppm), conforme instruções do fabricante, e mantida em imersão por 15 minutos; e no tratamento T₃ a hortaliça foi higienizada com 1L de água e vinagre em uma concentração de 6,6% (NASCIMENTO & ALENCAR, 2014), e mantida em imersão por 15 minutos. Logo após, todos os tratamentos, exceto o tratamento controle, foram higienizados com água corrente.

4.1.2 Análise microbiológica das hortaliças

Cerca de 25 g da alface foram coletadas de diferentes pontos da hortaliça já higienizada, com o auxílio de uma pinça estéril. Posteriormente, foi adicionado 225 mL de solução salina estéril (0,85%) à hortaliça, obtendo-se assim a primeira diluição, correspondente a 10⁻¹. A homogeneização da mistura foi realizada com auxílio de um “stomacher” por 60 segundos. A partir dessa primeira diluição foram realizadas diluições decimais seriadas (10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵), semeadas na superfície dos meios seletivos, obtendo 7 números de amostras.

Os microrganismos investigados para avaliação do processo de higienização foram bactérias aeróbias mesófilas heterotróficas em ágar padrão para contagem (PCA, Difco), fungos filamentosos e leveduras (ágar batata dextrose, pH 3,5, HIMedia) e coliformes totais e *E. coli* (ágar chromID coli ID, Biomerieux). As placas contendo os meios PCA e Chrom ColiID foram incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas, enquanto que o ágar batata dextrose foi incubada $25 \pm 1^\circ\text{C}$, por 7 dias. Após o período de incubação, as placas contendo entre 30 e 300 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foram selecionadas, contadas e os resultados foram expressos em UFC/g do alimento analisado.

4.1.3 Análise parasitológica das hortaliças

Após realizadas as diluições seriadas, as amostras, referentes a diluição 10^{-1} , foram processadas conforme o método de Lutz, também conhecido como Método de Hoffmann, Pons e Janer, (1934) ou Técnica de Sedimentação Espontânea. Essa técnica é utilizada para diagnosticar ovos e larvas de helmintos e cistos de protozoários (CHAVES et al., 2006). As amostras contendo solução salina foram acondicionadas em béqueres sob placa de agitação por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram filtradas, com auxílio de funil com gaze para cálices de sedimentação identificados, mantidos na geladeira por período overnight. Após 24 horas, foi coletada uma alíquota do material do fundo do cálice (sedimento), com o auxílio de uma pipeta de 200 μL e transferido para uma lâmina (uma gota). Posteriormente, a lâmina foi montada adicionando-se uma gota de lugol ao sedimento coletado e uma lamínula. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico binocular Nikon/Eclipse E100..

4.1.4 Análise estatística

Para análise estatística dos sete resultados obtidos com os tratamentos foi empregada a Análise de Variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey, para a verificação de diferenças estatísticas (nível de significância de 5%), em relação aos microrganismos investigados.

4.2 Capacitação dos Manipuladores de alimentos sobre Boas Práticas de Manipulação (BPM)

O material didático elaborado para o curso de capacitação foi preparado com base no Regulamento Técnico de Boas Práticas de Serviços de Alimentação (BRASIL, 2004), além de cartilhas e imagens livres disponíveis na internet sobre capacitação de manipuladores de alimentos. Durante as aulas foram reproduzidos vídeos que estavam disponíveis para uso no site da ANVISA (BRASIL, 2015). A cartilha de apoio foi desenvolvida para transmitir as informações de maneira simples e prática aos manipuladores, utilizando imagens ilustrativas, com frases curtas dos procedimentos corretos a serem utilizados. Dentre os quais, a sequência passo a passo para adequada higienização das hortaliças, das mãos e etc. Além disso atividades práticas ilustrando a necessidade da realização da correta higienização das mãos, utensílios, equipamentos e superfícies e a prevenção da contaminação cruzada também foram planejadas e desenvolvidas ao longo do curso de capacitação.

4.5 Qualidade microbiológica e parasitológica de amostras de hortaliças higienizadas e servidas cruas no estabelecimento, após a capacitação dos manipuladores quanto as BPM

4.5.1 Coleta das amostras

No segundo dia do curso de capacitação, após o treinamento sobre higienização de frutas e hortaliças, uma amostra hortaliça higienizada foi coletada para análise microbiológica. Posteriormente, foi feito um monitoramento das hortaliças higienizadas e servidas para o consumo no restaurante, com a coleta de duas amostras, duas vezes por semana, durante dois meses. As amostras foram acondicionadas em sacos estéreis e transportadas até o Laboratório de Microbiologia do Pólo Ajuda (UFRJ – Campus Macaé), sob refrigeração, onde foi conduzida a análise microbiológica e parasitológica das mesmas.

4.5.2 Análise microbiológica e parasitológica

Para o preparo da amostra, cerca de 25 g da alface foi coletada de diferentes pontos da hortaliça (superfície e profundidade) com o auxílio de pinças estéreis e acondicionadas em sacos estéreis. Posteriormente, foi adicionado 225mL de solução salina estéril (0,85%) à hortaliça, obtendo-se assim a primeira diluição, correspondente a 10^{-1} . A mistura foi homogeneizada por 60 segundos em “stomacher”. A partir dessa primeira diluição foram realizadas diluições decimais seriadas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}), semeadas na superfície dos meios seletivos e inoculadas nos tubos contendo com caldo EC.

Para esse ensaio, além das contagens dos microrganismos indicadores de qualidade (contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e fungos filamentosos e leveduras) e de segurança (Coliformes totais e *E. coli*) conforme seção 3.1.2, também foi determinado o número mais provável (NMP/g) de coliformes termotolerantes, conforme previsto na RDC nº 12/2001 (Brasil, 2001).

A análise dos coliformes termotolerantes foi realizada em caldo EC pela técnica dos tubos múltiplos. Uma alíquota de 1 ml das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} da amostra homogeneizada foi inoculada em cada tubo contendo 10 ml de caldo EC (Difco) e tubos de Durham invertidos. Incubou-se os tubos a $45 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, por 24 a 48 horas em banho-maria. Após esse período os tubos que apresentaram turvação e produção de gás foram considerados positivos. Os resultados foram expressos como NMP/g do alimento analisado após consultar a tabela do NMP (BRASIL, 2010).

Para a análise parasitológica, o mesmo procedimento citado anteriormente foi adotado.

5 Resultados e Discussão

5.1 Avaliação da eficácia de diferentes métodos de higienização de hortaliças

A partir dos resultados das contagens de bactérias aeróbias mesófilas totais, fungos filamentosos e leveduras, coliformes totais e *E. coli* (Figuras 1, 2, 3 e 4) obtidas nos diferentes tratamentos (T₀: Controle; T₁: água; T₂: Hipoclorito de sódio e T₃: Vinagre) observa-se que de uma forma geral os tratamentos promoveram uma redução das contagens em relação ao controle (T₀: amostras não lavadas).

Na análise de fungos filamentosos e leveduras total (Figura 1), foi possível observar que não houve redução estatisticamente significativa das contagens obtidas no controle e tratamento com água, enquanto que os tratamentos em que foi utilizado hipoclorito de sódio ou vinagre apresentaram uma redução significativa em relação ao controle. Os valores médios de unidades logarítmicas de UFC/g (log UFC/g) encontrados foram 6,2; 5,5; 4,7; 4,9 para T₀, T₁, T₂ e T₃, respectivamente.

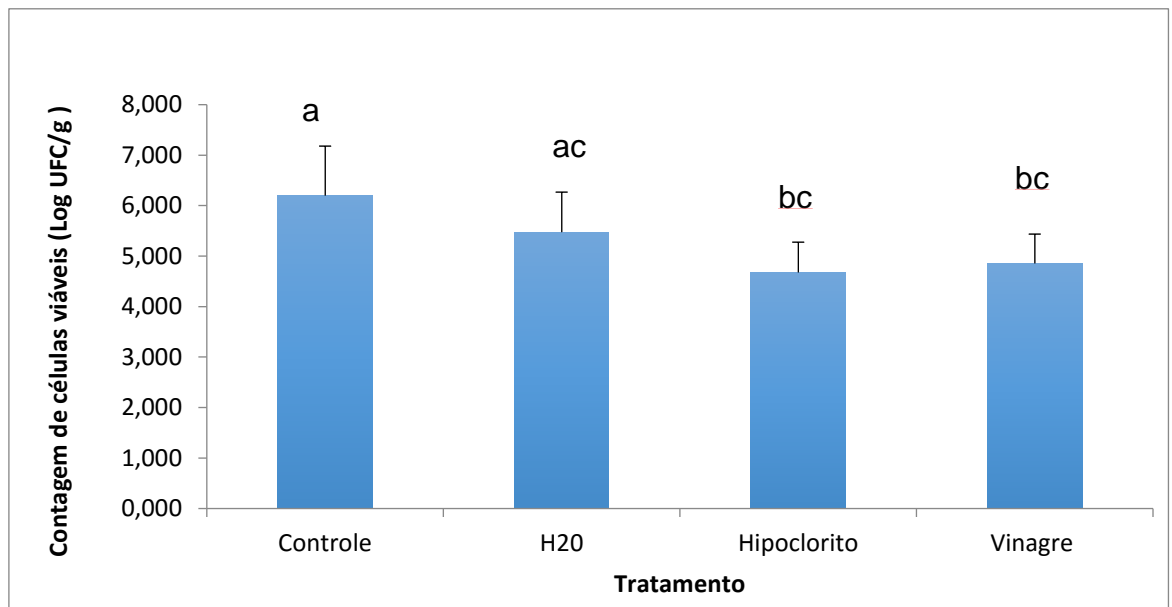


Figura 1– Contagem de fungos filamentosos e leveduras (log de UFC/g) dos quatro tratamentos avaliados.

^(a-c) Letras iguais indicam que não houve diferença significativa e letras diferentes indicam que o resultado da análise apresentou diferença significativa (One Way ANOVA, Tukey pós-teste; $p < 0,05$).

Portanto, os resultados apresentados na figura 1 demonstram que a higienização realizada com o hipoclorito de sódio e vinagre foi efetiva promovendo uma redução significativa de fungos filamentosos e leveduras totais quando comparadas com o controle. Este fato reafirma a necessidade da correta manipulação

e preparo desses alimentos, seguindo as Boas Práticas de Manipulação, a fim de garantir as condições higiênicas desse produto, frequentemente consumidos crus.

Os sanificantes testados neste estudo são utilizados pela maioria da população brasileira, e recomendados pela ANVISA como medidas a serem adotadas nas BPM (EMBRAPA, 2006). Por este motivo é importante que haja uma maior divulgação de seu uso correto e real eficácia.

Já foi constatado que ao seguir as instruções do Ministério da Saúde sobre a utilização da água sanitária como sanificante, respeitando o tempo e concentração indicada, esta foi eficaz quando comparado ao sanificante comercial a base de cloro e ao vinagre, evidenciando a importância de se estudar mais sobre o tema e apresentar modelos educativos com relação à sanificação de hortaliças, verduras e frutas para a população (MACEDO, 2011).

Na contagem de bactérias mesófilas total (Figura 2), foi possível notar que em relação ao controle houve uma redução estatisticamente significativa para todos os tratamentos. Além disso, houve uma redução significativa no tratamento com vinagre (T₃) quando comparado ao tratamento com a água (T₀). Os valores médios das contagens em log (UFC/g) encontrados para bactérias totais aeróbias mesófilas foram 6,8; 5,9; 5,6 e 5,2 para T₀, T₁, T₂ e T₃, respectivamente.

Em trabalho realizado por TADEU et. al. (2007), concluiu-se que o vinagre constitui uma boa alternativa para a sanitização de hortaliças substituindo os compostos clorados, pois estes vêm apresentando uso limitado devido à formação de substâncias cancerígenas.

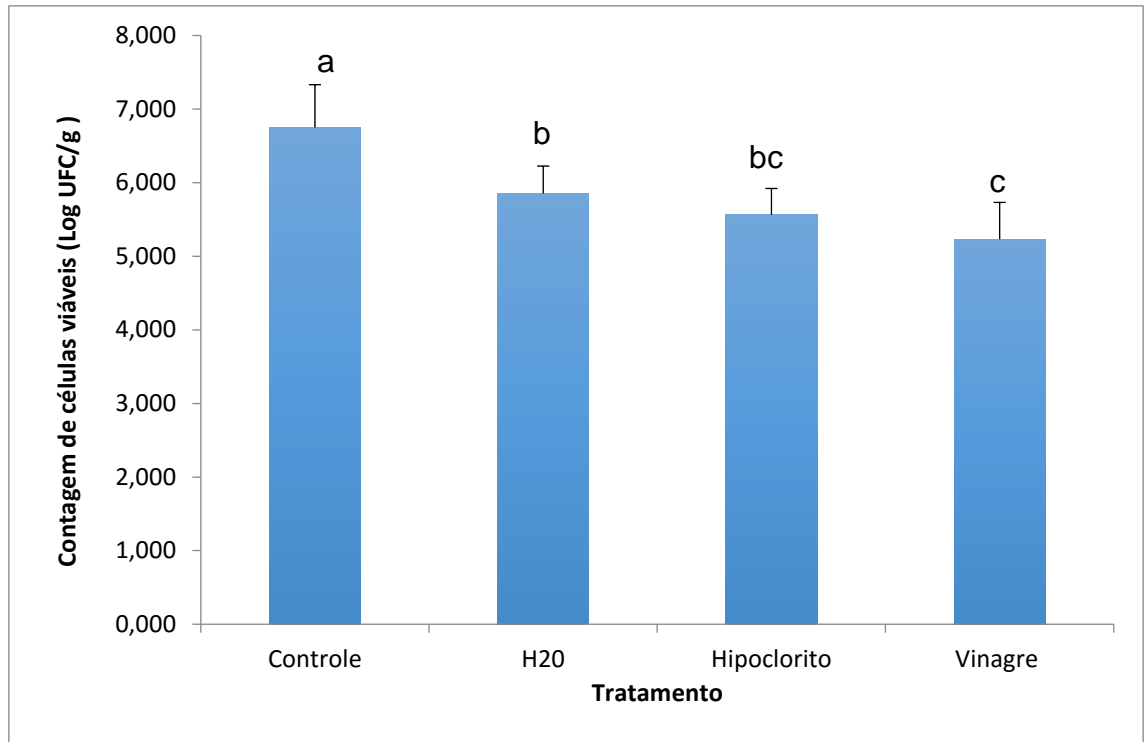


Figura 2 – Contagem Bactérias mesófilas total (log de UFC/g) dos quatro tratamentos avaliados.

(a-c) Letras iguais indicam que não houve diferença significativa e letras diferentes indicam que o resultado da análise apresentou diferença significativa (One Way ANOVA, Tukey pós teste; $p < 0,05$).

O estudo de NASCIMENTO (2003) comparou a ação de diferentes desinfetantes na sanitização de uvas e retratou que os melhores resultados para microrganismos aeróbios mesófilos e bolores e leveduras foram atingidos, quando o ácido acético foi utilizado. Entretanto, como havia uma baixa contaminação inicial de coliformes totais e fecais (média 1,67 logUFC/g), todos os sanitizantes utilizados (hipoclorito de sódio a 200 ppm, vinagre a 6%, 25% e 50%, ácido peracético a 80 ppm, ácido acético a 2% e 4%, dicloroisocianurato de sódio a 200ppm), apresentaram desempenho semelhante frente a esses grupos de microrganismos. Os tratamentos a base de ácido acético foram melhores ou semelhantes à ação do hipoclorito de sódio, no entanto, comparando os dois compostos clorados utilizados, ambos tiveram ação similar.

No gráfico para contagem de coliformes totais (Figura 3), grupo considerado indicador de segurança microbiológica, foi possível observar que em relação ao controle houve uma redução estatisticamente significativa somente no tratamento com vinagre. Para pesquisa de *E. coli* somente a amostra controle apresentou contagem, com valores médios de 4,2 unidades log de UFC/g. Os valores médios de log (UFC/g)

encontrados para coliformes totais foram 5,4; 4,6; 4,1 e 3,4 para T₀, T₁, T₂ e T₃, respectivamente.

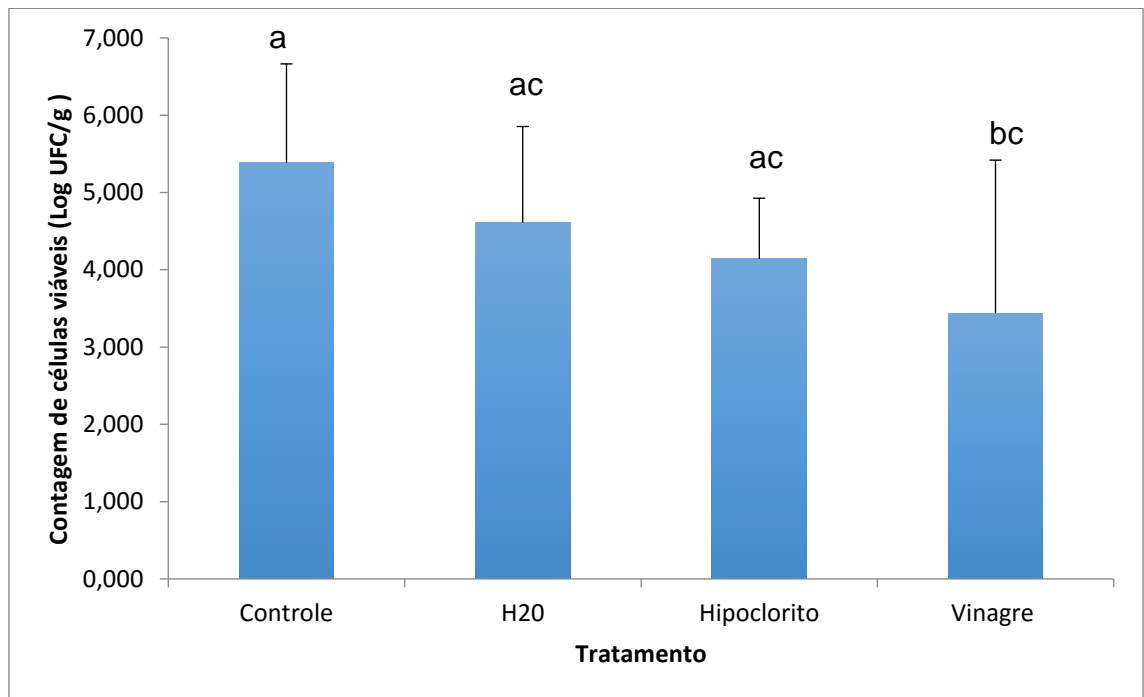


Figura 3 – Contagem de coliformes totais (log de UFC/g) dos quatro tratamentos avaliados.

^(a-c) Letras iguais indicam que não houve diferença significativa e letras diferentes indicam que o resultado da análise apresentou diferença significativa (One Way ANOVA, Tukey pós teste; $p < 0,05$).

Ao comparar os resultados obtidos neste estudo com o de NASCIMENTO (2003), a contaminação inicial por coliformes totais e fecais no presente estudo, com média 5,4 logUFC/g foi mais alta que a do outro autor (média 1,67 logUFC/g). Isto pode ser reflexo do saneamento básico deficiente do município ou da falta de boas práticas nas etapas de plantação, armazenamento e transporte do alimento.

Já em estudo realizado por OLIVEIRA (2005), a contaminação inicial por coliformes totais e fecais em alfaces obteve média de 1,21 logUFC/g, sendo também menor que a média encontrada neste estudo, reforçando a hipótese da contaminação a partir da água com saneamento precário.

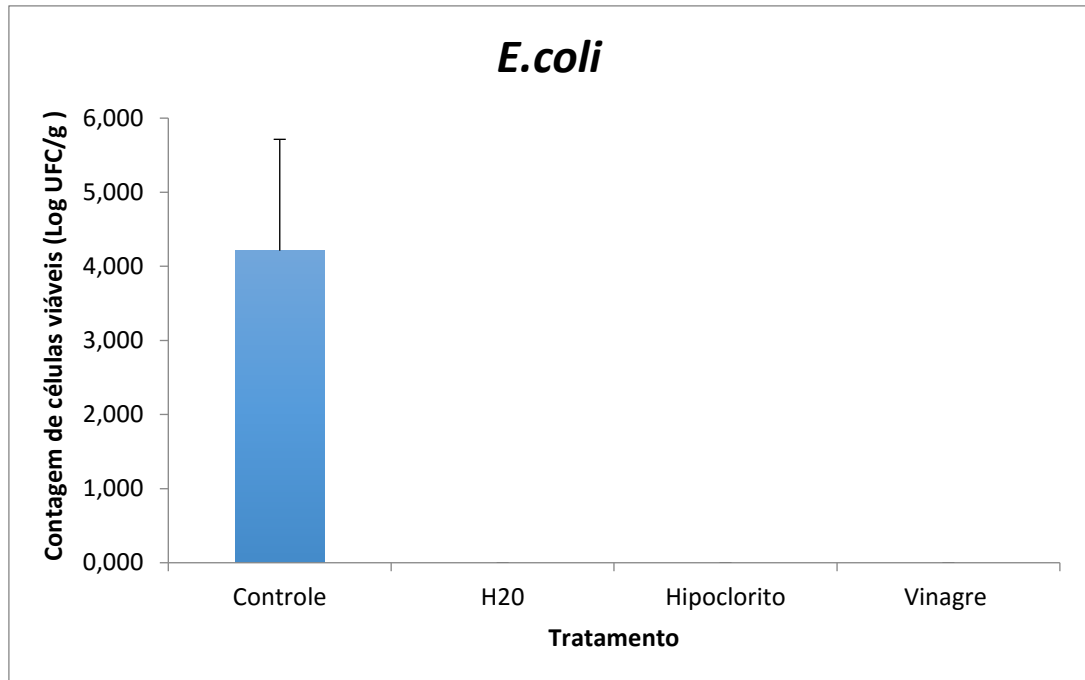


Figura 4 - Contagem *E. coli* (log de UFC/g) dos quatro tratamentos avaliados.

Diante do resultado encontrado na contagem de *E. coli*, podemos constatar que apenas um simples processo de lavagem foi suficiente para remover tal microrganismo do alimento, provavelmente devido à baixa contaminação inicial das alfaces com essa espécie de microrganismo. Nascimento (2003) encontrou valores médios de contaminação inicial para *E. coli* menores que 1,0 logUFC/g.

De acordo com a média inicial, 4,2 logUFC/g encontrado neste estudo, mais uma vez pode-se concluir que as etapas anteriores, como por exemplo, a etapa de plantio ou transporte, apresentam falhas em relação as boas práticas, já que apenas uma simples lavagem foi o suficiente para remover tais microrganismos.

Segundo OLIVEIRA (2005) também é necessário considerar que os principais surtos relacionados ao consumo de hortaliças ocorrem pela presença de *E. coli* 0157:H7, que possui uma baixa dose infectante (aproximadamente 100 UFC/g). Porém no presente trabalho, houve detecção de *E. coli* apenas no tratamento T₀, no qual não foi realizado nenhum tipo de lavagem ou sanitização.

Na análise parasitológica, foram detectados cistos de *Entamoeba histolytica*, ovos de *Ascaris lumbricoides* e larvas de ancilostomídeos ou *Strongyloides stercoralis* nos tratamentos T₀ e T₁ (Figura 5), mostrando que a higienização com o hipoclorito de sódio e vinagre foram efetivos para remoção dos parasitas.

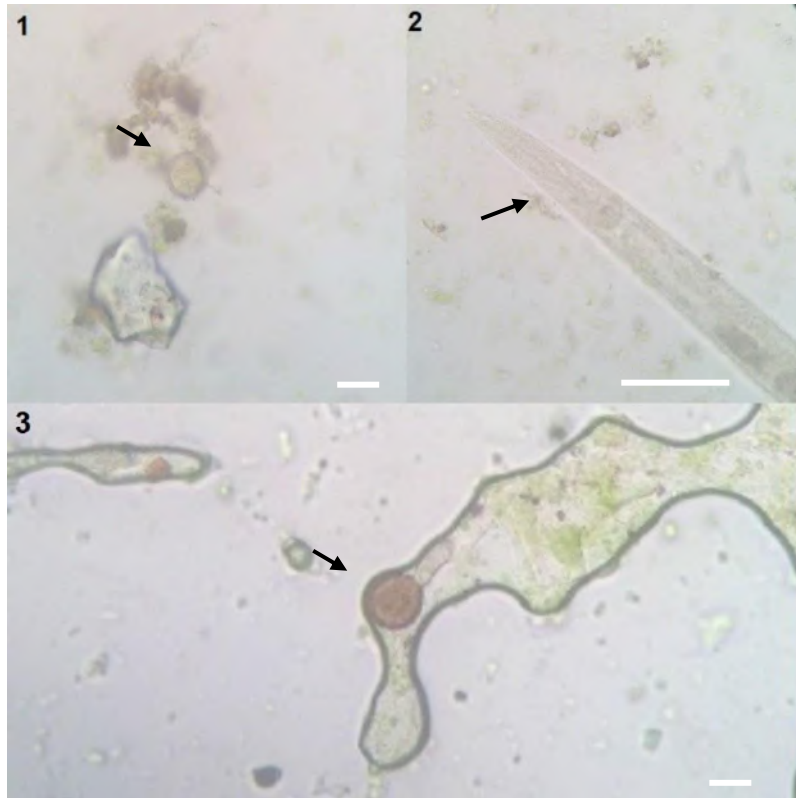


Figura 5: Fotos dos parasitas encontrados nas amostras antes do curso. 1 e 3: ovos de *Ascaris lumbricoides* encontrados em amostras de alface (Barras: 50 µm e 100 µm, respectivamente). 2: Larva de ancilostomídeo ou *Strongyloides stercoralis* (Barra: 5 µm).

A contaminação por estes parasitas nas hortaliças analisadas nesse estudo, sugere a ocorrência de práticas higiênicas sanitárias inadequadas nos locais de cultivo dessas amostras, como já descrito anteriormente (NASCIMENTO & ALENCAR, 2014). Cistos de *Entamoeba histolytica*, ovos de *Ascaris lumbricoides*, larvas de ancilostomídeos e larvas de *Strongyloides stercoralis* são as formas contaminantes destes parasitas para o homem, sendo altamente resistentes no meio externo e associadas com a veiculação por água e alimentos contaminados e infecção ativa pela penetração das larvas na pele do homem.

Parasitas como *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* sugerem uma possível propagação associada a práticas de irrigação inadequadas, que muitas vezes são feitas com água

de fontes contaminadas, visto que tais parasitas são enteroparasitas de veiculação hídrica (FALAVIGNA et. al, 2005). Além disso, o reuso de material proveniente de estações de tratamento de esgoto como adubo para cultivo de vegetais só pode ser realizado após a análise microbiológica e parasitológica deste material. A presença de ovos de *Ascaris lumbricoides* é um dos requisitos para a não reutilização deste material como adubo orgânico, uma vez que este ovo é altamente resistente às condições do meio externo e a diversos tratamentos higienizantes utilizados (Paulino et al., 2001, Norma Técnica CETESB L5.551, 2013).

5.2 Desenvolvimento de material educativo e a capacitação dos manipuladores

Uma cartilha de apoio sobre higienização de hortaliças, foi elaborada, baseada nos conceitos de Boas Práticas de Manipulação (Figura 6) (BRASIL, 2004), contendo ilustrações e linguagem simplificada. Esta foi impressa e fornecida aos manipuladores durante o curso de capacitação, facilitando a visualização dos alunos em relação ao procedimento de higienização. Além disso, um pôster sobre higienização das mãos também foi elaborado, impresso e exposto na cantina, onde os manipuladores foram treinados. As aulas teóricas foram elaboradas com recursos áudio visuais e projetadas com auxílio de um Datashow.



Figura - 6 Cartilha elaborada para os alunos do curso com instruções de como higienizar a alface.

Um estudo elaborado por Crisitina (2013) também empregou para a confecção do material de treinamento métodos variados de exposição do conteúdo, destacando

que treinamentos devem explorar as diversas formas de aprendizado, como sentidos visual, auditivo, prática, discussão em grupo, etc., empregando linguagem adequada ao público alvo, que seja atrativa e desperte o estímulo, de forma a despertar a atenção dos alunos, e criar o interesse e comprometimento dos mesmos.

O curso de Capacitação de Manipuladores de Alimentos foi realizado na Cantina Universitária de um dos Polos do Campus UFRJ/Macaé. A ação educativa teve uma carga horária total de 8 horas, divididas em 4 aulas teóricas e 2 aulas práticas (Figura 7), abordando os seguintes temas: contaminantes alimentares, doenças transmitidas por alimentos, manipulação higiênica dos alimentos e boas práticas, conforme previsto na Resolução RDC 216/2004 (BRASIL, 2004).

Nesta ação os conceitos teóricos foram fundamentados nas conclusões obtidas com os experimentos práticos realizados durante o curso. Atividades práticas de apoio para cada um dos temas abordados foram utilizadas valorizando a participação ativa dos manipuladores. O objetivo principal da prática educativa foi capacitar os manipuladores de alimentos com relação às boas práticas de manipulação e quanto aos processos de higienização, facilitando a adoção de medidas que minimizem o risco de contaminação dos alimentos. Foi utilizada uma linguagem simplificada e rica em recursos audiovisuais para facilitar o aprendizado dos manipuladores. As ações educativas práticas foram realizadas no próprio ambiente de trabalho e contaram com as seguintes atividades: dinâmica de contaminação de mãos e contaminação cruzada.

Segundo Souza *et al* (2006), há uma maneira eficaz de se educar o manipulador que é fazê-lo conhecer como os microrganismos potencialmente veiculadores de doenças de origem alimentar atuam no hospedeiro humano e o que deve ser feito para oferecer alimentos seguros, além de ensiná-los a maneira correta de higienização de alimentos, do ponto de vista microbiológico.

Inicialmente, houve uma resistência dos manipuladores para assistir as aulas, porém, como o objetivo era repassar o conteúdo com simplicidade e dinâmica, gradativamente os manipuladores sentiram-se confortáveis em participar das aulas, dando relatos de experiências próprias de sua rotina diária, promovendo uma troca de informações e introduzindo o conteúdo de forma mais natural. Desta forma, todo o conteúdo foi transmitido. Os manipuladores participaram das práticas com curiosidade e quando os resultados eram divulgados, os funcionários se mostravam interessados e surpresos (Figura 7).



Figura 7 Fotos da aula prática e da aula teórica.

Segundo CRISTINA et. al. (2013), após o curso os manipuladores dão maior importância em higienizar corretamente todos os vegetais, folhosos e frutas que serão consumidos sem casca e crus.

As principais dificuldades encontradas no aprendizado dos manipuladores deste estudo foram: o nível de escolaridade, que dificulta a compreensão de conteúdos abstratos e entendimento sobre a importância da manipulação adequada para garantir a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos; a indisponibilidade de horários para a realização do treinamento e a ausência de participação da gerência. Outros elementos tidos como obstáculos à mudança de hábito foram os vícios que os funcionários adquirem durante o transcorrer de sua vida profissional ou em outras empresas. Devido à existência de manipuladores com nível de escolaridade baixo, optou-se pelo uso de material educativo mais prático, envolvendo grande quantidade de figuras e vídeos, tornando a participação destes manipuladores mais efetiva.

Além das dinâmicas e atividades práticas realizadas durante o curso, experimentos em laboratório também foram conduzidos de modo a monitorar a adoção dos procedimentos de BPF e utilizar essas informações como forma de incentivo e desafio aos manipuladores, para melhoria das atividades rotineiras. Após o curso, foi observado que algumas condutas estavam sendo praticadas de forma correta pelos manipuladores. Entretanto, alguns detalhes ainda necessitavam de melhoria e adequação, como a elaboração e execução de Procedimentos Operacionais Padrão (POP), propostos no curso de Capacitação, para várias atividades realizadas no restaurante, dentre as quais a higienização das frutas e hortaliças.

A ANVISA (BRASIL, 2002), através da RDC 275 aprova o regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados (POP) aplicados à lista de verificação das BPF de alimentos, que tem como objetivo estabelecer os padrões operacionais padronizados que contribuam para a garantia das condições higiênico-sanitárias necessárias ao processamento de alimentos, complementando as BPF.

O POP é um documento que descreve passo a passo como executar as tarefas no estabelecimento, e destaca como fazer, quem deve fazer, a frequência, e os materiais necessários à realização da tarefa. (BRASIL, 2002).

O POP é de grande importância pois padroniza as atividades, obrigando o manipulador a seguir os procedimentos, eliminando assim, os detalhes que ainda possam necessitar de melhorias.

5.3 Qualidade microbiológica e parasitológica de amostras de hortaliças higienizadas e servidas cruas no estabelecimento após a capacitação

Após o curso de capacitação, foi realizado um monitoramento do processo de higienização das hortaliças e da qualidade microbiológica e parasitológica por 60 dias.

Nesse período, foi observado que apesar dos manipuladores continuarem higienizando as hortaliças seguindo as orientações repassadas no curso, de forma a garantir a qualidade das hortaliças oferecidas, nem sempre a dosagem recomendada e o tempo de ação do sanificante eram checados por algum responsável.

Um total de 16 amostras de hortaliças higienizadas e servidas cruas no restaurante foram analisadas e o resultado das contagens de bactérias totais aeróbias mesófilas, fungos filamentosos e leveduras, coliformes totais, *E. coli*, coliformes termotolerantes e presença de parasitos está demonstrado na Tabela 3.

Em relação aos indicadores de qualidade, o valor médio da contagem de bactérias aeróbias mesófilas totais encontrado foi de $3,75 \times 10^5$ UFC/g, variando de $8,8 \times 10^3$ UFC/g a $3,8 \times 10^6$ UFC/g (est). Já os valores obtidos para contagem de fungos filamentosos e leveduras, apresentaram média $3,0 \times 10^5$ UFC/g, variando de $3,0 \times 10^3$ UFC/g e máximo de $1,9 \times 10^7$ UFC/g. Os valores médios obtidos para ambos os grupos de microrganismos indicadores avaliados foram equivalentes (mesma ordem de grandeza) àquelas contagens obtidas nas amostras higienizadas (vinagre

e/ou hipoclorito) previamente no laboratório, onde foi avaliado os métodos de higienização (Seção 5.1).

Para coliformes totais, o valor médio encontrado foi de $3,8 \times 10^3$ UFC/g, com mínimo de $1,6 \times 10^3$ UFC/g e máximo de $3,8 \times 10^6$ UFC/g (est). Três amostras apresentaram contagens para *E. coli* variando de $1,0 \times 10^2$ a $3,0 \times 10^3$ UFC/g.

Tabela 3 Análise microbiológica e parasitológica das hortaliças higienizadas coletadas no restaurante, após o curso, com sua condição higiênico-sanitária. Amostras em negrito foram consideradas impróprias para consumo, segundo RDC 12/2001 (BRASIL, 2001).

Amostras	Data	BMA (UFC/g)	FFL (UFC/g)	CT (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)	CTT (NMP/g)	Parasitas	Condição higiênico- sanitária
Alface	04/09	9,0x10 ³	2,0x10 ⁷	3,0x10 ³	5,5 x 10 ³	< 3x10 ¹	-	Satisfatório
	22/09	2,0x10 ⁶	1,0x10 ⁵	3,0x10 ⁵	<1,0 x 10 ²	< 3x10 ¹	-	Satisfatório
	23/09	4,0x10 ⁵	3,0x10 ³	8,0x10 ³	<1,0 x 10 ²	< 3x10 ¹	-	Satisfatório
	01/10	3,0x10 ⁵	1,0x10 ⁵	2,0x10 ³	2,0x10 ²	2,5x10²	-	Insatisfatório
	14/10	3,5x10 ⁴	1,5 x 10 ⁵	2,5 x 10 ³	<1,0 x 10 ²	9,5x10 ¹	-	Satisfatório
	28/01	2,0x10 ⁵	2,5 x 10 ⁵	3,0 x 10 ⁴	<1,0 x 10 ²	2,5x10 ¹	-	Satisfatório
Couve	15/09	4,0x10 ⁶ est ^a	1,5 x 10 ⁵	9,0 x 10 ⁵	<1,0 x 10 ²	2,5x10²	-	Insatisfatório
	16/09	2,0x10 ⁶	2,0 x 10 ⁴	3,0 x 10 ⁴	<1,0 x 10 ²	2,5x10 ¹	-	Satisfatório
	22/09	6,5x10 ⁵	2,0 X 10 ⁵	6,0 X 10 ⁵	3,0 X 10 ³	< 3x10 ¹	-	Satisfatório
	23/09	6,0x10 ⁴	3,0 X 10 ³	6,0 X 10 ³	<1,0 x 10 ²	2,5x10²	Cisto de <i>Giardia lamblia</i> Ovo de <i>Ascaris lumbricoides</i> .	Insatisfatório
	01/10	5,0x10 ⁵	6,5 X 10 ⁵	2,5 X 10 ³	1,0 X 10 ²	2,5x10²	Ovos de <i>Ascaris lumbricoides</i> .	Insatisfatório
	02/10	2,5x10 ⁵	6,5 X 10 ⁵	2,0 X 10 ⁵	<1,0 x 10 ²	2,5x10 ¹	-	Satisfatório
	14/10	2,5x10 ⁴	1,5 x 10 ⁵	2,5 x 10 ³	<1,0 x 10 ²	9,5x10 ¹	Ovos de <i>Ascaris lumbricoides</i> .	Insatisfatório
	28/10	4,0x10 ⁵	8,0 x 10 ⁴	4,0 x 10 ⁶ est.	<1,0 x 10 ²	1,0x10 ¹	-	Satisfatório
Agrião	14/10	5,0x10 ⁵	2,0 X 10 ⁴	2,0 x 10 ⁴	<1,0 x 10 ²	1,0x10³	Ovos de <i>Ascaris lumbricoides</i> .	Insatisfatório
	28/10	1,5x10 ⁵	5,0 x 10 ⁵	5,5 x 10 ³	<1,0 x 10 ²	7,5x10 ¹	-	Satisfatório

^aest: Número estimado, fora do intervalo (30-300 UFC) aceitável de contagem, segundo a técnica utilizada; BMA – Bactérias mesófilas aeróbias totais; FFL – Fungos filamentosos e leveduras; CT – Coliformes totais; CCT – Coliformes termotolerantes.

Como citado anteriormente, a resolução RDC nº 12 de 2001 publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001) estabelece os padrões microbiológicos para alimentos, incluindo amostras de hortaliças frescas, "in natura", preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas) sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto. Esta legislação estabelece que hortaliças (legumes e similares) frescas, "in natura", preparadas (descascadas, selecionadas ou fracionadas) sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto devem apresentar coliforme de origem fecal (NMP): máximo, 10^2 coliformes termotolerantes/g e ausência de *Salmonella* spp. em 25g do alimento (BRASIL, 2001).

A partir do resultado da contagem de coliformes termotolerantes obtidos das hortaliças coletadas no restaurante após a capacitação, foi possível constatar que cinco amostras (31% - valores em negrito) se encontram com valores acima do limite estabelecido pela resolução anteriormente citada e foram consideradas impróprias para o consumo. Embora a referida legislação também preconize ausência de *Salmonella* sp. em 25g do alimento analisado, a pesquisa deste último microrganismo não foi realizada, limitando a conclusão sobre aprovação global das amostras analisadas, de acordo com a legislação vigente.

Embora estivessem higienizadas, as hortaliças estavam impróprias para consumo, e a possível causa disto se encontra na falha em relação às boas práticas e ao cumprimento das etapas estabelecidas no POP.

Segundo estudo realizado por NASCIMENTO (2014), a determinação do NMP/g de coliformes totais e termotolerantes em amostras tratadas com agentes higienizantes apontou que todas as amostras tratadas com solução de ácido acético a 6,6% mantiveram níveis elevados de contaminação por coliformes totais, enquanto que para coliformes termotolerantes apenas 50% dos estabelecimentos analisados apresentaram média global de contaminação aceitável, conforme a legislação brasileira.

No restaurante onde foi realizado o presente estudo, o agente utilizado também era o ácido acético, em relação ao controle, as amostras tratadas com este agente não mantiveram níveis elevados de contaminação por coliformes totais, e para coliformes termotolerantes, a média de contaminação encontrou-se elevada.

No presente estudo, os valores encontrados para aeróbios mesófilos não estavam dentro dos limites relatados por BRACKETT (1994), já os fungos filamentosos e leveduras, encontram-se parcialmente dentro dos limites normais,

embora ambos não sejam regulamentados por lei no Brasil. Estes limites são de 4,0 logUFC/g para microrganismos aeróbios mesófilos e 6,0 logUFC/g para fungos filamentosos e leveduras, em média.

Os resultados obtidos a partir da análise parasitológica, revelaram que quatro amostras estavam impróprias para consumo, já que houve a presença de parasitos, como ovos de *Ascaris lumbricoides* e cistos de *Giardia lamblia* (Figura 8), dentre as quais, três em comum com os resultados insatisfatórios para padrão microbiológico.

Relacionando os resultados obtidos dos microrganismos indicadores com os parasitas observamos que seis amostras (37,5%) se encontraram impróprias para o consumo, já que mesmo com os limites de microrganismos indicadores dentro dos padrões aceitáveis, uma amostra de couve (dia 14/10) apresentou ovos de *Ascaris lumbricoides*, considerando-a imprópria para consumo.

O estudo investigativo de parasitas intestinais tem por finalidade precisar as doenças relevantes e seus respectivos agentes etiológicos que se encontram repartidos por todo o mundo, de forma endêmica ou epidêmica, examinando as áreas de maior incidência ou prevalência e os elementos que favorecem a proliferação dessas parasitoses, para que possam ser diagnosticados e utilizados programas de controle e de tratamento (PEREIRA; FERREIRA; KOIFMAN, 2008).

A partir dos resultados encontrados neste trabalho, pode-se considerar elevado o percentual de contaminação por helmintos e protozoários, uma vez que as amostras encontravam-se higienizadas. Portanto, esperava-se que estes não fossem detectados nas amostras. Isso pode advir em razão da contaminação do solo e da água de irrigação, desde a colheita até a preparação nas cozinhas de casas, escolas e outros logradouros, tendo em vista a dificuldade que o município de Macaé enfrenta com relação ao saneamento básico, além da contaminação realizada pelo próprio manipulador, que pode não seguir conceitos básicos de educação sanitária, como o ato de lavar as mãos após a utilização do sanitário. Além disso, a lavagem das hortaliças deve ser realizada com água corrente antes e após a sanificação, uma vez que os ovos de parasitos possuem a capacidade de se aderirem à superfície da hortaliça, exigindo também uma lavagem mecânica do alimento.

A higienização de frutas e hortaliças contaminadas com ovos de *Ascaris lumbricoides* se torna mais difícil, uma vez que eles possuem grande capacidade de aderir a superfícies (no ambiente ou em alimentos), não sendo removidos com facilidade por lavagens (Massara et al., 2003). Acha & Szyfres (1997); Gostin et al.

(2000) comprovaram que 100% de contaminação por helmintos provavelmente ocorre pelo contato estreito de tal parte do vegetal com o solo que pode abrigar água contaminada e fezes de animais de sangue quente. Já Gostin et al. (2000) e Pacheco et al. (2002) supuseram que a água de irrigação, sem controle prévio pode ser a potencial fonte de surto de doenças parasitárias.

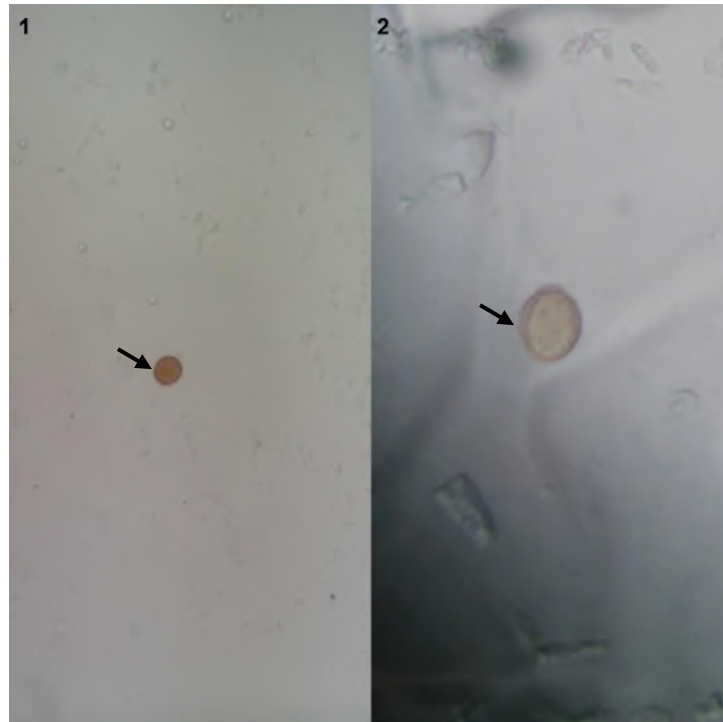


Figura 8: Fotos dos parasitas encontrados nas amostras após o curso. 1: ovo de *Ascaris lumbricoides* encontrados em amostras de couve. 2: cisto de *Giardia intestinalis* encontrado em uma amostra de couve.

6 Considerações finais

6.1 Conclusão

De uma forma geral, os tratamentos de higienização testados promoveram uma redução das contagens microbiológicas, sendo o tratamento com vinagre aquele que apresentou uma redução estatisticamente significativa em relação ao controle, para todos os microrganismos testados. *E. coli* e parasitos foram encontrados apenas nas amostras controle, as quais não foram higienizadas, comprovando a eficácia dos procedimentos.

Essa informação foi utilizada como orientação no curso de capacitação dos manipuladores de alimentos, no qual o tema foi discutido e demonstrado a importância de se utilizar a metodologia correta de higienização para frutas e hortaliças.

Cerca de 37% das hortaliças servidas na cantina, avaliadas após o curso de capacitação, foram consideradas impróprias para consumo, demonstrando falha no processo de higienização realizado pelos manipuladores, não garantindo a inocuidade desses alimentos, uma vez que ovos de determinados parasitos possuem a capacidade de aderir à superfície do alimento, necessitando de uma higienização mecânica para sua retirada.

Esses dados evidenciaram a importância da implementação das boas práticas de manipulação nos serviços de alimentação do município, com adoção de POPs e adequação das não conformidades, em todas as etapas de produção do alimento, para a garantir o fornecimento de alimentos seguros ao consumidor.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M. Métodos de detecção de microrganismos indicadores. **Saúde & ambiente em revista**, p. 9–13, 2006.
- ANVISA. Instrução Normativa RESOLUÇÃO - RDC Nº 12, DE 2 DE JANEIRO DE 2001. **Anvisa - Agência Nacional De Vigilância Sanitária.**, p. 48, 2001.
- ANVISA. RDC nº216, de 15 de setembro de 2004. **Diário Oficial da União**, p. 1–47, 2004.
- ANVISA/CSV. PORTARIA CVS Nº 18 DE 09 DE SETEMBRO DE 2008. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, 2008.
- BAPTISTA, P.; ANTUNES, C. **Higiene e Segurança Alimentar na Restauração**. [s.l: s.n.]. v. 2
- BRASIL. Resolução - RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002. **ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, p. 126, 2002.
- BRASIL, M. DA SAÚDE. Doenças Transmitidas por Alimentos. **[Http://Portalsaude.Saude.Gov.Br/Images/Pdf/2015/Julho/01/Arquivo-1-Dta.Pdf](http://Portalsaude.Saude.Gov.Br/Images/Pdf/2015/Julho/01/Arquivo-1-Dta.Pdf)**, 2015.
- CHAVES, É. M. S. et al. Levantamento de Protozoonoses e Verminoses nas sete creches municipais de Uruguaiana , Rio Grande do Sul – Brasil . **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n. 1, p. 39–41, 2006.
- CONEN. RELATÓRIO DE SANEAMENTO BÁSICO DO MUNICÍPIO DE MACAÉ. v. 80, 2010.
- COSAPA. Água não tratada é porta aberta para Doenças de veiculação hídrica. p. 10–23, 2011.
- CRISTINA, C.; GOMES, B. **ELABORAÇÃO DE MATERIAL DE TREINAMENTO DE MANIPULADORES DE ALIMENTOS PARA UMA REDE HOTELEIRA**. [s.l: s.n.].
- DE MESQUITA, D. R. et al. OCORRÊNCIA DE PARASITOS EM ALFACE-CRESPA (*Lactuca sativa* L.) EM HORTAS COMUNITÁRIAS DE TERESINA, PIAUÍ, BRASIL. **Revista de Patologia Tropical**, v. 44, n. 1, p. 67–76, 2015.
- DO AMARAL, L. A. et al. Água De Consumo Humano Como Fator De Risco À Saúde Em Propriedades Rurais. **Revista de Saude Publica**, v. 37, n. 4, p. 510–514, 2003.
- EMBRAPA. Recomendações básicas para a aplicação das Boas Práticas Agropecuárias e de Fabricação na agricultura familiar. v. 1, n. 2, p. 81–87, 2006.
- ESTEVES, F.; FIGUEIRÔA, E. Detecção De Enteroparasitas Em Hortaliças Comercializadas Em Feiras Livres Do Município De Caruaru (Pe). **Revista Baiana de Saúde Pública**, p. 38–47, 2012.
- FRANCO, B.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, 1996.

GARCIA, D. M. Treinamento em Boas Práticas para manipuladores de alimentos. **M**, v. 1, p. 36, 2007.

LIMA, C. Presença de Microrganismos Indicadores de Qualidade em Farinha e Goma de Mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz). p. 14–19, 2007.

MACAÉ, P. DE. **Macaé - Informações Socioeconômicas**.

MACEDO, M. E. **Avaliação dos sanitizantes para eliminação dos ovos de *Toxocara canis* em alface (*Lactuca sativa* L.).** [s.l: s.n.].

MARCHI, D. M. et al. Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Município de Chapecó, Estado de Santa Catarina, Brasil, no período de 1995 a 2007. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 3, p. 401–407, 2011.

MARIA, L.; ADOLFO, G.; PINTO, S. Aplicação de cloro no preparo de hortaliças Chlorine use in fresh vegetables aiming domestic consumption *Material e Métodos*. v. 35, p. 259–263, 2004.

MESQUITA, M. O. DE et al. Qualidade microbiológica no processamento do frango assado em unidade de alimentação e nutrição. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 198–203, 2006.

NASCIMENTO, A. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE ANTIMICROBIANOS A CEPAS DE ENTEROBACTERIACEAE ISOLADAS DE AMOSTRAS DE ALFACE (*Lactuca sativa*) COMERCIALIZADA NA CIDADE DE SÃO LUÍS-MA. **Igarss 2014**, n. 1, p. 1–5, 2005.

NASCIMENTO, E. D. DO; ALENCAR, F. L. S. Eficiência Antimicrobiana E Antiparasitária De Desinfetantes Na Higienização De Hortaliças Na Cidade De Natal - Rn. **Ciência e Natura**, v. 36, n. 2, p. 92–106, 2014.

NASCIMENTO, M. Avaliação Comparativa de Diferentes Desinfetantes na Sanitização de Uva Comparison of Disinfectants for Sanitation of Grape. p. 63–68, 2003.

OLIVEIRA, A. B. A. Comparação de diferentes protocolos de higienização de alface (*Lactuca sativa*) utilizada em restaurantes de Porto Alegre - RS. 2005. 58 f. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 2005.**

OLIVEIRA, T.; BOHNER, L.; NISHIJIMA, T. O Impacto Ambiental Do Uso De Agrotóxicos No Meio Ambiente E Na Saúde Dos Trabalhadores. **Revista Eletrônica do Curso de Direito**, v. 3, p. 329–341, 2012.

PARISH, M. E. et al. Methods to Reduce/Eliminate Pathogens from Fresh and Fresh-Cut Produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n. s1, p. 161–173, 2003.

PEREIRA, C. R. A.; FERREIRA, A. P.; KOIFMAN, R. J. Detecção de *Cryptosporidium parvum* em alfaces frescas para consumo cru . Estudo de caso : Teresópolis , Rio de Janeiro , Brasil. **Ecologia**, v. 2, n. 1, p. 31–36, 2008.

RESENDE, F. V. et al. Cultivo de Alface em Sistema Orgânico de Produção. **Embrapa**, v. 56, p. 1 – 16, 2007.

SAPERS, G. M. Efficacy of Washing and Sanitizing Methods for Disinfection of Fresh Fruit and Vegetable Products. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 305–311, 2001.

SAÚDE. DOENÇAS RELACIONADAS À ÁGUA OU DE TRANSMISSÃO HÍDRICA - Perguntas e Respostas e Dados Estatísticos –. p. 1–25, 2009.

SAÚDE. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos - VE-DTA. p. 1 – 35, 2014.

SILVA, M. C. DA. Avaliação Da Qualidade Microbiológica De Alimentos Com a Utilização De Metodologias Convencionais E Do Sistema Simplate. **2**, p. 1–87, 2002.

SPADOTTO, C. A. Agricultura Brasileira : importância , perspectivas e desafios para os profissionais dos setores agrícolas e florestais. 2005.

TADEU, Y. Qualidade Sanitária De Hortaliças Cultivadas Em Um Distrito Sanitário De Salvador-Ba E Eficiência Um Distrito Sanitário De Salvador-Ba E Eficiência. 2007.

TAVARES, M. “CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE CEPAS PATOGÊNICAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE QUEIJO MINAS FRESCAL”. 2011.

TUCCI, C. E. M. Gerenciamento da drenagem urbana. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 7, n. 1, p. 5–27, 2002.

VERÍSSIMO, A.; MORAIS, P. MÉTODO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL. p. 1–5, 2006.

WHO. **IDEXX Literature Cover Sheet**. [s.l: s.n.].

YEARBOOK, G. Anuário Brasileiro de Hortaliças 2015. p. 1 – 68, 2015.

SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA; TANIWAKI; SANTOS; GOMES; OKAZAKI, 2007. **MANUAL DE MÉTODOS DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS. Editora da Universidade Federal de Santa Maria**, v. 1, n. 3, p. 1-107, 2007.